

ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

# ХАБАРШЫ

Биология сериясы

---

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

# ВЕСТНИК

Серия биологическая

---

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

# EXPERIMENTAL BIOLOGY

---

№1 (90)

Алматы  
“Қазақ университеті”  
2022



# ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №1 (90) наурыз



04. 05. 2017 ж. Қазақстан Республикасының Ақпарат және коммуникация министрлігінде тіркелген

Қуәлік № 16494-Ж

Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады  
(наурыз, маусым, қыркүйек, желтоқсан)

## ЖАУАПТЫ ХАТШЫ

Сапарғалиева Н.С., б.ғ.к., аға оқытушы (Қазақстан)  
e-mail: bb.kaznu.kz@gmail.com

## РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:

**Бисенбаев А.Қ.**, б.ғ.д., ҚР ҰҒА академигі (ғылыми редактор) (Қазақстан)  
**Бекманов Б.О.**, б.ғ.к., доцент (ғылыми редактордың орынбасары) (Қазақстан)  
**Төлеуханов С.Т.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Айташева З.Г.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Кистаубаева А.С.**, б.ғ.к. (Қазақстан)  
**Ивашенко А.Т.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Мухитдинов Н.М.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Нургазин С.Т.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Турусбеков Е.К.**, б.ғ.к., қауымдастырылған профессор (Қазақстан)

**Омаров Р.Т.**, PhD (Қазақстан)  
**Искаков Б.К.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Сарбасов Д.**, PhD, профессор (АҚШ)  
**Орынбаева З.**, PhD, профессор (АҚШ)  
**Курмашева Р.Т.**, PhD (АҚШ)  
**Сапарбаев М.**, PhD, профессор (Франция)  
**Ищенко А.**, PhD (Франция)  
**Лось Д.**, б.ғ.д., профессор (Ресей)  
**Ташев А.Н.**, профессор (Болгария)

## ТЕХНИКАЛЫҚ ХАТШЫ

Смекенов Изат, PhD (Қазақстан)

Журнал материалдарында ауқымды биологиялық мәселелері – ғылыми шолу, теориялық және эксперименталдық зерттеулердің нәтижелері қарастырылады.

Мақалалар биологияның келесі бөлімдері бойынша жарияланады: ботаника, биотехнология, биохимия, өсімдіктер физиологиясы, генетика және молекулалық биология, клеткалық биология, биофизика, адам және жануарлар физиологиясы, зоология және ихтиология, цитология және гистология, микробиология және вирусология.



Комитет по обеспечению качества  
в сфере образования и науки  
МОН РК



РОССИЙСКИЙ ИНДЕКС  
НАУЧНОГО ЦИТИРОВАНИЯ  
Science Index



## Жоба менеджері

Гульмира Шаккозова  
Телефон: +7 701 724 2911  
E-mail: Gulmira.Shakkozova@kaznu.kz

## Компьютерде беттеген

Айгүл Алдашева

## ИБ №

Пішімі 60x84/16. Көлемі 0 б.т. Тапсырыс № 0.  
Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің  
“Қазақ университеті” баспа үйі.  
050040, Алматы қаласы, әл-Фараби даңғылы, 71.  
“Қазақ университеті” баспа үйінің баспаханасында  
басылды.

1-бөлім  
**БОТАНИКА**

---

Section 1  
**BOTANY**

---

Раздел 1  
**БОТАНИКА**

A.A. Ivashchenko<sup>1</sup> , R.E. Kaparbay<sup>2,3\*</sup> , B.B. Arynov<sup>3</sup> ,  
N.M. Mukhitdinov<sup>2</sup> , G. Sramko<sup>4</sup> , K.T. Abidkulova<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Institute of Zoology, KN MES RK, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>3</sup>SNNP «Kolsay kolderi» CFW MEENR RK, Kazakhstan, r. Almaty

<sup>4</sup>Department of Botany of the University of Debrecen, Debrecen, Hungary

\*e-mail: raushan.kaparbay@mail.ru

## PLACES OF GROWTH AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *HEPATICAL FALCONERI* (THOMS.) STEWARD AT THE NORTHERN BORDER OF ITS DISTRIBUTION AREA

The article provides the most up to date information on the distribution of the red-listed species *Hepatica falconeri* (Thoms.) Steward (Ranunculaceae), and on its ecological and altitudinal preferences within the mountain ranges of southeastern Kazakhstan based on the analysis of literature sources, herbarium specimens, data from the site <https://www.plantarium.ru/>, as well as our own research. The authors' data confirm that the studied species is a forest petromesophilic ecological element. As a result of the research, the floristic composition of plant communities with the participation of *H. falconeri* in the Taldy gorge (northern macroslope of the Kungei Alatau) was established. It is represented by 107 species from 46 families. The most important are 13 families (64.5%): Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Rosaceae, Ranunculaceae, Apiaceae, Crassulaceae, Caryophyllaceae, Orchidaceae, Lamiaceae, Geraniaceae, Papaveraceae and Primulaceae. The floristic core of the describe communities consists of 15 species: *Picea schrenkiana*, *Atragene sibirica*, *Ribes meyeri*, *Lonicera stenantha*, *Rosa alberti*, *Sedum hybridum*, *S. ewersii*, *Aegopodium alpestre*, *Fragaria vesca*, *Geranium collinum*, *Galium turkestanicum*, *Poa nemoralis*, *Polypodium vulgare*, *Kaufmannia semenovii*, *Rheum wittrockii*, which are forest, forest-meadow or petro-lithophilic ecological-phytocenotic elements. We studied some morphometric parameters of *H. falconeri*. The bract consists of three upper stem leaves, and the calyx, in most cases (94.5%), of six sepals. The latter parameter has a small coefficient of variation and, in our opinion, is a stable trait of this species. Due to the early and long flowering period, *H. falconeri* is of interest for introduction as an ornamental plant.

**Key words:** rare species, area, altitude, aspect, *Hepatica falconeri*, Kungey Alatau

А.А. Иващенко<sup>1</sup>, Р.Е. Қапарбай<sup>2,3\*</sup>, Б.Б. Арынов<sup>3</sup>,  
Н.М. Мухитдинов<sup>2</sup>, Г. Шрамко<sup>4</sup>, К.Т. Абидкулова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ҚР БҒМ ҒК «Зоология институты» ШЖҚ РМК, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup>ҚР ЭГТРМ ОШЖДК «Көлсай көлдері» мемлекеттік ұлттық табиғи паркі РММ, Қазақстан, Алматы облысы

<sup>4</sup>Дебрецен университетінің ботаника кафедрасы, Венгрия, Дебрецен қ.

\*e-mail: raushan.kaparbay@mail.ru

### Аймақтың солтүстік шекарасындағы *Hepatica falconeri* (Thoms.) steward таралу ерекшеліктері және биологиясы

Мақалада Қызыл кітапқа енгізілген түр *Hepatica falconeri* (Thoms.) Steward (Ranunculaceae) әдеби дереккөздерді, гербарий үлгілерін, <https://www.plantarium.ru/> сайтынан алынған деректерді және жеке зерттеулерді талдау негізінде Қазақстанның оңтүстік-шығысындағы тау жоталары шегіндегі экологиялық және биіктіктегі бойынша мәліметтер берілген. Авторлардың мәліметтері зерттелетін түрдің орман-мезофильді экологиялық элемент екенін растайды. Зерттеу нәтижесінде Талды шатқалындағы (Күнгей Алатауының солтүстік макробеткейі) *H. falconeri* қатысуымен өсімдік қауымдастықтарының флоралық құрамы анықталды. Ол 46 тұқымдастың 107 түрімен ұсынылған, олардың 13-і (64,5%): Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Rosaceae, Ranunculaceae, Apiaceae, Crassulaceae, Caryophyllaceae, Orchidaceae, Lamiaceae, Geraniaceae, Papaveraceae және Primulaceae. Сипатталған қауымдастықтардың флоралық ядросына 15 түр кіреді: *Picea schrenkiana*, *Atragene sibirica*, *Ribes meyeri*, *Lonicera stenantha*, *Rosa alberti*, *Sedum hybridum*, *S. ewersii*, *Aegopodium alpestre*, *Fragaria vesca*, *Geranium collinum*, *Galium turkestanicum*, *Poa nemoralis*, *Polypodium vulgare*, *Kaufmannia semenovii*, *Rheum wittrockii* орманды, орманды-шалғынды немесе петро-литофильді экологиялық және фитоценотикалық элементтерге жатады. *H. falconeri* кейбір



морфометриялық параметрлері нақтыланды. Сабағы 3 жоғарғы бағаналы сабақ жапырақтардан тұрады, көп жағдайда күлтежапырақтары (94.5%) – 6 жапырақтан тұрады. Соңғы индикатор вариация коэффициентінің төмен деңгейіне ие және авторлардың пікірінше, бұл түрдің тұрақты белгісі. Ерте және ұзақ гүлдену кезеңіне байланысты *H. falconeri* сәндік өсімдік ретінде енгізуге қызығушылық тудырады.

**Түйін сөздер:** сирек түр, аумақ, биіктік, аспект, *Hepatica falconeri*, Күнгей Алатау

А.А. Ивашченко<sup>1</sup>, Р.Е. Капарбай<sup>2,3\*</sup>, Б.Б. Арынов<sup>3</sup>,  
Н.М. Мухитдинов<sup>2</sup>, Г. Шрамко<sup>4</sup>, К.Т. Абидулова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РГП на ПХВ «Институт зоологии» КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>3</sup>РГУ «Государственный национальный природный парк «Көлсай көлдері» КЛХЖМ МЭГПР РК, Казахстан, Алматинская область

<sup>4</sup>Кафедра ботаники Дебреценского университета, Венгрия, г. Дебрецен

\*e-mail: raushan.kaparbay@mail.ru

### Особенности распространения и биологии *Hepatica falconeri* (Thoms.) steward на северной границе ареала

В статье предоставлены уточненные сведения о распространении краснокнижного вида *Hepatica falconeri* (Thoms.) Steward (Ranunculaceae), экологической и высотной приуроченности в пределах горных хребтов юго-востока Казахстана на основе анализа литературных источников, гербарных образцов, данных с сайта <https://www.plantarium.ru/> и собственных исследований. Данные авторов подтверждают, что исследуемый вид является лесным петромезофильным экологическим элементом. В результате исследований установлен флористический состав растительные сообщества с участием *H. falconeri* в ущелье Талды (северный макросклон Күнгей Алатау). Он представлен 107 видами из 46 семейств, ведущими из которых являются 13 (64,5%): Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Rosaceae, Ranunculaceae, Apiaceae, Crassulaceae, Caryophyllaceae, Orchidaceae, Lamiaceae, Geraniaceae, Papaveraceae и Primulaceae. Флористическое ядро описанных сообществ включает 15 видов: *Picea schrenkiana*, *Atragene sibirica*, *Ribes meyeri*, *Lonicera stanantha*, *Rosa alberti*, *Sedum hybridum*, *S. ewersii*, *Aegopodium alpestre*, *Fragaria vesca*, *Geranium collinum*, *Galium turkestanicum*, *Poa nemoralis*, *Polypodium vulgare*, *Kaufmannia semenovii*, *Rheum wittrockii*, относящихся к лесным, лесо-луговым или петро-литофильным эколого-фитоценоотическим элементам. Уточнены некоторые морфометрические параметры *H. falconeri*. Прицветное покрывало состоит из 3 верхних стеблевых листьев, околоцветник в большинстве случаев (94.5%) – из 6 листочков. Последний показатель имеет низкий уровень коэффициента вариации и, по мнению авторов, является устойчивым признаком данного вида. В связи с ранним и продолжительным периодом цветения *H. falconeri* представляет интерес для интродукции как декоративное растение.

**Ключевые слова:** редкий вид, ареал, высота, аспект, *Hepatica falconeri*, Күнгей Алатау

## Introduction

Rare plants with limited distribution ranges and low abundances are especially vulnerable to the global climate change and the constantly increasing anthropogenic impact on natural ecosystems. Their numbers are declining due to the influence of unfavourable natural or anthropogenic factors, for example, due to harvesting as medicinal raw materials or as ornamental plants. In the late 1960s, Commissions for the protection of rare species were created on an international and national scales, and then the Red Data Books of the International Union for Conservation of Nature (IUCN) and of individual countries were created. Later, in the majority of countries, including Kazakhstan, Red Books and Strategies for the conservation of

biological diversity were developed and published [1, 2].

First of all, attention should be paid to the study and protection of species of the first category, defined as “endangered: species in immediate danger of extinction; their further existence is impossible without the implementation of special protection measures” [3]. In Kazakhstan, one of such rare species listed in the Red Book of Kazakhstan (2014) is *Hepatica falconeri* (Thoms.) Steward from the family Ranunculaceae Juss. Moreover, this species has been insufficiently studied, in contrast to another representative of the genus, *Hepatica nobilis* Mill. (*H. triloba* Gilib.) which is widespread in the north of the European Russia, the Baltic States and Western Europe [4, 5, 6, 7]. Due to its high decorative qualities, *H. nobilis* has been widely cultivated since

1440 [8]. This species has also been studied in detail in natural populations, including its morphological, anatomical and biological characteristics, flowering, seed germination, pollen structure, as well as karyology; there were also comparative studies involving representatives of other genera of the family Ranunculaceae [9, 10, 11, 12, 13].

In contrast to *H. nobilis*, the information available in the literature on *H. falconeri* is fragmentary and in many cases contradictory. This applies to all species' characteristics: its distribution range in Kazakhstan, morphological features, ecological and phytocenotic preferences, phenology in nature, and the population numbers and population structure.

In this regard, the purpose of our work was a complete revision of the available literary and herbarium information on this species, verification of its distribution range in Kazakhstan, and the study of the ecological, morphological and biological features of the natural populations growing on the northern slope of the Kungey Alatau, including an assessment of their condition and development of recommendations for their improved protection. In this article, we present the first results of our research.

### Materials and Methods

The studies were carried out on the territory of the State National Natural Park (GNPP) "Kulsay kulderi" (established by the Decree of the Government of the Republic of Kazakhstan No. 88 dated February 7, 2007), in 2018–2020.

One of the methods was a route-reconnaissance survey of the territory. Field trips were carried out in the spring, summer and autumn, when, in addition to studying the general composition of the flora and monitoring of permanent plots, we purposefully searched for the populations of *H. falconeri*. The survey was carried out using existing maps of the area, as well as a GPS navigator (GPS ETREX 20, Garmin). All locations were recorded and surveyed in detail. To do so, geobotanical plots were established, the survey of which was carried out according to the generally accepted method [14]. To study the floristic composition of the communities, about 100 herbarium specimens were collected and processed. The species were identified using the main reports [15, 16, 17]. Considering that *H. falconeri* is a rare and poorly studied species, special attention was paid to the study of its morphological characteristics. For this, measurements of generative and vegetative individuals (50–100) were carried out,

and data on the morphological variability of flowers and fruits were collected (also 50–100 individuals at each point).

To verify the distribution range of *H. falconeri* in Kazakhstan, all available floristic summaries and other literary sources, as well as the herbarium of the Kazakh National University named after S. al-Farabi, the Institute of Botany and Phytointroduction (Almaty), the herbarium of the Moscow State University [18] and materials from the Plantarium website [19] were consulted.

In this article, the taxonomic affiliation of species is given according to the summary by S.A. Abdulina [20]. Statistical data processing was carried out using the Descriptive Statistics MS Excel 2007 program.

### Results and Discussion

The genus *Hepatica* Mill. belongs to a large family Ranunculaceae Juss. of the subclass Ranunculidae, which is closely related to the most ancient order of angiosperms, Magnoliidae [21]. According to the researchers who analyzed the geography of this family [22, 23], it is distinguished by a high level of generic endemism: 32% of all genera are distributed only in one specific floristic region, as reported by A.L. Takhtadzhyan [21]. The level of species endemism is even higher, about 50%, and the highest number of endemics is concentrated in the largest genera (*Aconitum*, *Delphinium*, *Aquilegia*, *Ranunculus*, etc.). It is these large genera that have been most thoroughly studied by international researchers in terms of their phylogeny and origin [24].

Thanks to the use of a variety of research methods, it was possible not only to confirm the ancient origin of the family and to clarify its taxonomic and phylogenetic structure, but also to single out individual genera as independent families, for example, Paeoniaceae, and also to prove a closer relationship with other families than was previously thought, for example Berberidaceae [25, 26]. The results of this revision were confirmed by other authors and were reflected in the system of A.L. Takhtadzhyan [21].

The genus *Hepatica* is rather small. It has only about 10 species, the ranges of which cover four floristic regions of Eurasia and North America. It is believed to have a disjunct Eurasian-North American distribution. *Hepatica* is a relatively ancient genus, being a relic of the forest temperate flora of the early Tertiary period [23, 27, 28, 29].

Among the representatives of the genus, the most widespread is *Hepatica nobilis* Gars. which grows in deciduous forests of Western Europe, the Baltic States, Ukraine and six regions of the north of European Russia [4, 5, 6, 7]. A detailed study of this polymorphic species, in the distribution range of which S.V. Yuzepchuk [52] also included the Far East region, made it possible to distinguish several independent taxa, including *H. asiatica* Nakai, *H. yamatutai* from Primorye and Japan, as well as *H. maxima* Nakai from Korea [30, 31, 32].

The best known species, *H. nobilis*, officially described by K. Linnaeus in 1753 under the name *Anemone hepatica* L., due to its extensive distribution in densely populated Europe, as well as high decorativeness (the species has been cultivated for almost 500 years [8]) has been studied in detail; however, this is not the case when *H. falconeri* is considered.

*H. falconeri* (Figure 1) was described in 1952 from Kashmir and, was originally assigned to the genus *Anemone* [51]. However, S.V. Yuzepchuk, when studying these closely related genera for the report “Flora of the USSR”, transferred it to the genus *Hepatica*, describing it as a new combination. This opinion was later adopted by both Soviet and international taxonomists who studied pollen, karyotypes, and morphology of these two closely related genera [9, 10, 23, 29, 32, 33, 34].



**Figure 1** – Mass flowering of *H. falconeri*.  
LVL Taldy Gorge, 1694 m above sea level, 15.05.2019

### Distribution area in Kazakhstan

According to the habitat type, *H. falconeri* is a Dzungar-Himalayan species; it has been found from the Tien Shan to the Himalayas, in Iran, Kashmir,

India, Pakistan, and Western China [16, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40]. The northern border of the distribution area is in Kazakhstan. In Kyrgyzstan, this species grows in the Fergana region, including the Alai ridge (the point of the Archaty pass was indicated by S.V. Yuzepchuk, 1937), and the Western Tien Shan [41]. In the Issykkul depression, all known locations are on the southern slope of the Kungey Alatau, the Chon-Aksu gorge [19].

In Kazakhstan, *H. falconeri* was originally recorded only in the Zailiyskiy Alatau (Tobulga-Su), where in 1884, E. Regel described a variety of the species, *H. falconeri* var. *semenovii* Regel [15, 16]. Later, it was reported from two ridges, Dzhungarsky and Zailiysky [37], Dzhungarsky and Kungei [42], Zailiysky and Ketmen [2]. Unfortunately, data on the occurrence of this rare species in specific locations of individual ridges became available only in recent years: along the Dzhungarskiy Alatau, the Kugaly gorge [43]; along the Ketmen ridge, the Hasansai gorge, near the village Kolzhat [44]. The most incomprehensible is the situation with the distribution of *H. falconeri* in the Zailiyskiy Alatau, because, apart from the above-mentioned reference by E. Regel provided in the “Flora of the USSR” and “Flora of Kazakhstan”, there are no other confirmations. A photograph of a vegetating specimen provided by I.I. Kokoreva (2007) is of a different plant (most likely, it is a rosette of *Trollius dshungarica*) [45]. A report by I.O. Baytulina et al. [46] with a reference to M.G. Popova [47] refers not to the Zailiyskiy Alatau, but to another ridge, since the author gives only one point, the Kungei Alatau, the Taldy gorge. In the collections of the Institute of Botany and Phytointroduction, there are herbarium specimens of *H. falconeri* from only two ridges (Table 1).

Thus, *H. falconeri* is most widespread, almost along the entire ridge, in Ketmentau. In 2018–2020, during the survey in the Kungey Alatau, as a result of special searches, we managed to find several isolated cenopopulations of the species studied, but only in the valley of the river Taldy. In the gorges of Saty and Kurmeta, where *H. falconeri* was recorded by S.K. Mukhtubaeva [48], we have not yet been able to find any individuals of the species.

Since this species grows locally, in separate small populations, additional research is needed, which we are continuing at the present time. Another point of growth of *H. falconeri* requires verification. This is the Tarbagatai Ridge mentioned by Czech botanists in their monograph [49]. However, we have not yet found any support for this location either in herbariums or in other literary sources.



**Table 1** – Data from herbarium specimens of *Hepatica falconeri* (Thoms.). Steward

Ridge	Collection Location	Date	Collected by
Ketmen	Kyrgyzzay gorge, 5 km from Podgornoye, southeast	08.06.1970	Stepanova E.F.
	Tegermen gorge	17.06.1958	Godvinsky M.I.
	B. Murab gorge, under the rocks	05.07.1964	Roldugin I.I., Fisyun V.V.
Kungey Alatau	Taldysu pass, southern slope, rocks	01.07.1937	V.P. Goloskokov
	Merkov pass to Kyrgyzstan	02.07.1937	Gorbunova E.P.

### Ecological and phytocenotic features

The most common ecological conditions for *H. falconeri* are rocky slopes and rocks of the subalpine belt. This description of A.P. Gamayunova from “Flora of Kazakhstan” (1961) is repeated in most other literary sources [2, 42, 48], since their authors were usually familiar with this rare species because of the information available from publications and a few herbarium specimens. Unfortunately, this information concerns only some individual habitats of the species studied and does not fully reflect the features of its ecological preferences and altitudinal-belt distribution. The altitude range of the species was first mentioned by V.P. Goloskokov, who pointed out [37] that in the Dzhungarskiy Alatau, *H. falconeri* grows in cracks on rocks and stony slopes of the middle mountains. In terms of cenotic confinement, I.I. Roldugin [39], who had been researching spruce forests of the Northern Tien Shan for many years, provided the most accurate, in our opinion, ecological characterization of *H. falconeri*, assigning it to the “petromezophyton” ecomorphic group and the forest ecological-cenotic group. Later, such an extended range of altitude-ecological preferences of *H. falconeri* was confirmed in Pakistan, where it was found in forests within the altitudinal range of 1800–2800 m [40].

On the territory of SNPP “Kulsay kulderi”, in the lower part of the river valley Taldy at an altitude of 1692 m, there is the lowest in terms of altitude and, apparently, the most numerous mountainous population of this rare species in Kazakhstan. It was first reported by researchers from the Institute of Botany and the State Scientific and Production Enterprise “Kulsay kulderi” [50]. A monitoring plot was established there, where we began a more detailed study of this species in 2018.

Having analyzed all the materials on the ecological preferences of *H. falconeri* available to us, it should be emphasized that this species is distributed from the lower part of the spruce belt (1690

m) to the upper part of the subalpine belt (herbarium specimens of V.P. Goloskokov and E. Gorbunova from the passes Taldy and Merke). It grows on rocks of various steepness and expositions, clearly preferring eastern and north-eastern expositions; less often it is found on north-western and south-eastern slopes, and only single specimens are available from southern slopes (Goloskokov, herbarium). When substrate is considered, this species prefers rocks and stony slopes, sometimes it is found under spruce trees, and even less often, on soddy slopes.

The plant communities with the participation of *H. falconeri* are most often spruce forests, sparse grass associations with shrubs on rocky outcrops, or grass-forbs associations on hedged or stony slopes. According to our descriptions supplemented by literature data [48], in the valley of the river Taldy there are 107 species from 46 families. The most species rich 13 families are: Asteraceae (12 species), Fabaceae (9 species), Poaceae and Rosaceae (8 species each), Ranunculaceae (6 species), Apiaceae (5 species), Crassulaceae, Caryophyllaceae, Orchidaceae, Lamiaceae, Geraniaceae, Papaveraceae, Primulaceae (3 species each). The share of species from these families in the species list is about 64.5%. Nine families are represented by two species, and the remaining 24 families, by one species each. By the type of ecobiomorphs, herbaceous perennials prevail; there are 15 tree and shrub species, and only three annuals.

The most frequent companions of *H. falconeri* that make up the floristic core of communities with its participation are 15 species recorded in more than half of the descriptions: *Picea schrenkiana* Fisch. et C.A. Mey., *Atragene sibirica* L., *Ribes meyeri* Maxim., *Lonicera stanantha* Pojark., *Rosa alberti* Regel, *Sedum hybridum* L., *Sedum ewersii* Ledeb., *Aegopodium alpestre* Ledeb., *Fragaria vesca* L., *Geranium collinum* Steph., *Galium turkestanicum* Pobed., *Poa nemoralis* L., *Polypodium vulgare* L., *Kaufmannia semenovii* (Herd.) Regel, *Rheum wittrockii* Lundstr.

Apart from *H. falconeri*, only the last two species are listed in the Red Book of Kazakhstan (2014).

According to the ecological type, all of the floristic core species belong to the group of forest, forest-meadow, or petro-lithophilic ecological-phytocenotic elements according to I.I. Roldugin [39].

### Morphology and morphological variability

*H. falconeri* is a very rare and poorly studied plant, and the data on its morphology are limited to brief descriptions in floristic summaries [16, 36, 40, 49], which practically do not differ from the original description of T. Thomson [51] and the data provided by S.V. Yuzepchuk [52] in “Flora of the USSR”. In this regard, we consider it necessary to provide the most complete description of the generative specimens of the species studied, taking into account the available literature data and the results of our studies of the population in the Taldy gorge.

*H. falconeri* is a perennial herb with a short, fibrous rhizome, on top of which there are membranous oblong scales. There are few (3–12) leaves in the basal rosette. The petioles are long, pubescent, the plates are reniform-heart-shaped, divided into three rounded-rhombic lobes, which, in turn, are incised into 2-3 small lobes with obtuse or slightly pointed teeth. There is usually a single stalk, and only occasionally there are 2-4 stocks. The stock is thin, sinuous, slightly pubescent, usually the same length or

slightly longer than leaves. A characteristic feature of all representatives of the tribe Anemoneae including the *Hepatica* species is the presence of a bracts on the stem, formed by the whorls of the upper stem leaves [21, 23]. According to S.V. Yuzepchuk, the number of these leaves is 3-4, but according to our observations, there are usually three narrow sessile, entire leaves (we did not see a toothed leaf even once) [52]. Japanese botanists who studied samples of *H. falconeri* from north-eastern Pakistan indicate the shape of the veil leaves as one of the features distinguishing this species from *H. nobilis*, as well as making it similar to *Anemone flaccida* [32].

Flowers are single, bisexual, actinomorphic, with a spiral arrangement of elements, the number of which vary [21, 23]. The perianth is simple; its sepals are white, ovate-oblong in shape, with a blunt rounded apex. The data on the number of sepals are very different: for the genus, 6–10, and for *H. falconeri*, five or less often six sepals have been reported [16, 52].

We examined 400 flowers in four areas of the *H. falconeri* population on the left and right banks of the lower part of the Taldy river valley (1694–1710 m) and obtained very different data. Flowers with six sepals always predominate. On average, their share is 94.5%. In the second place (3%), there are flowers with five sepals. There are very few (1.7%) flowers with seven sepals, and only single flowers (0.3%) have eight sepals (Figures 2 and 3).



Figure 2 – Flowers of *H. falconeri* with different numbers of sepals

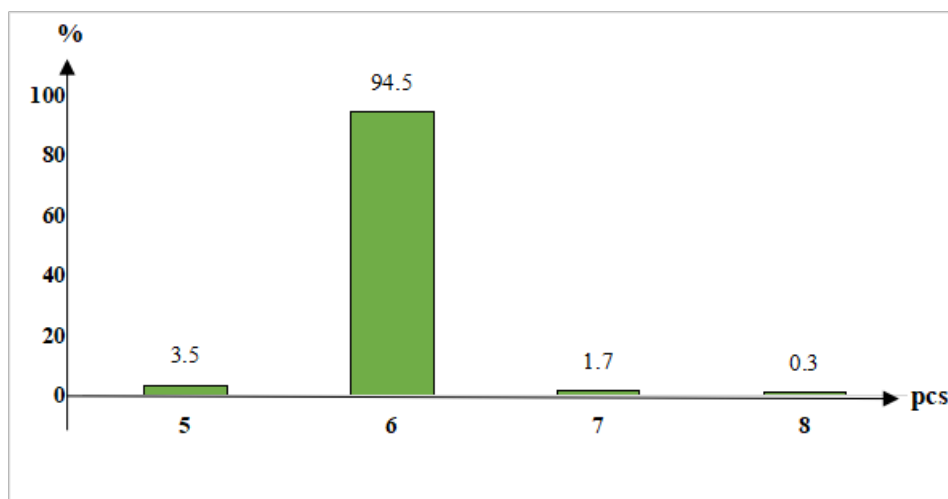


Figure 3 – Distribution of *H. falconeri* flowers by the number of sepals, %.

Thus, for *H. falconeri*, we consider flowers with six sepals to be the norm, while flowers with a reduced or increased number of sepals (5, 7, or 8) are less common. At least, such a pattern has been established for our research area. Therefore, it is necessary to collect additional material on this subject in other points of the species distribution range.

The numbers of other elements of the flower, androecium and gynoecium, vary. The *Hepatica* fruit is a multi-nutlet consisting of non-opening single-seeded nutlets [53]. In the descriptions of the species, the number of stamens and carpels is described

as “indefinitely many”. We made an attempt to analyze this character using generative individuals in one of the most numerous cenopopulations (Taldy, eastern rubble slope, moss-and-ground elder spruce forest, 1694 m above sea level). According to the results of 50 surveys, the number of nutlets per one fruit is very variable and ranges from five to sixteen, averaging 10.04. The distribution of such individuals is uneven: from 2 to 4% of individuals have minimum (5-7) and maximum (12-16) numbers of nutlets per one fruit, while up to 10% and even 20% of individuals have 9-12 nutlets (Figure 4).

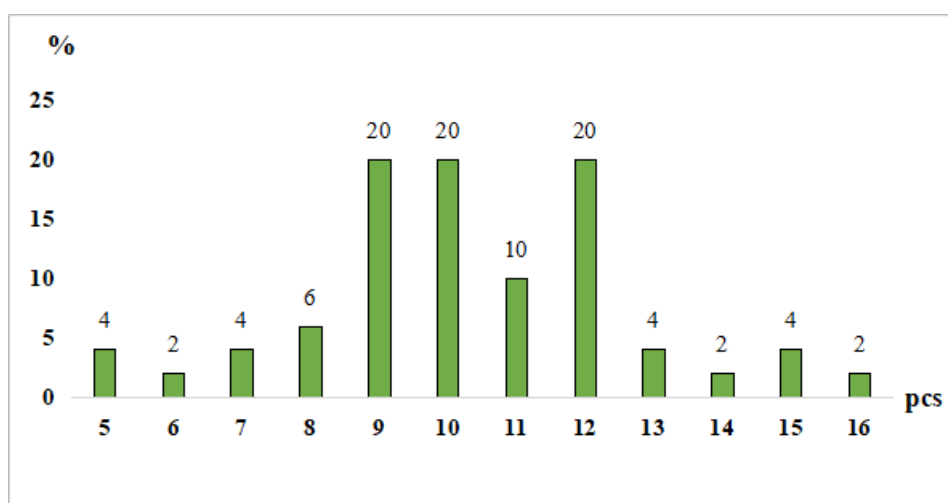


Figure 4 – Distribution of *H. falconeri* fruits by the number of nutlets, %

Our research established that the number of flowering stems in tufts of *Hepatica falconeri* is also very variable. It is associated not only with the age of generative individuals, but also with the habitat conditions. These data were obtained when studying two cenopopulations on the right bank of the river Taldy, lower (1710 m) and upper (Tsar's Gate gorge, 1914 m). In the first cenopopulation, the number of flowering stems per one generative individual is on average  $1.68 \pm 0.16$ , and in the second,  $1.4 \pm 0.16$ .

In both habitats, individuals with one generative stem (and single flower) prevail. However, the share of stronger individuals with three or four generative

stems in the cenopopulation at the lower border of the species distribution is quite high (15.7% in total), while at the upper border the number of generative stems per individual does not exceed two. In both cases, the proportions of individuals with one generative stem were nearly the same, 57.9% and 60%, respectively.

According to our data (Table 2), one more pattern can be observed. In individuals of the upper cenopopulation (No. 2), the vegetative parts are more developed: the average number of leaves per individual is 7.9, while in individuals from the lower cenopopulation, 6.1.

**Table 2** – Morphometric characteristics of generative individuals of *Hepatica falconeri* in different cenopopulations

Indicators	Cenopopulation 1		Cenopopulation 2	
	M±m	Cv, %	M±m	Cv, %
Stem height, cm	13.80±0.51	23.93	12.90±0.57	13.89
Clump diameter, cm	4.05±0.14	21.61	4.40±0.16	11.70
	2.59±0.09	21.43	3.3±0.15	14.63
Number of leaves	6.16±0.34	33.66	7.9±0.53	21.05
Number of sepals	5.95±0.03	4.71	6.10±0.23	12.13
Number of nutlets per one fruit	10.39±0.34	23.20	No data	

At the same time, the indicators of the generative parts were lower in individuals of the upper cenopopulation. In addition to differences in the number of flowering stems, there was also a decrease in their height depending on the habitat (Table 2). It is possible that this is due not only to the difference in elevation, but also in the illumination. Both cenopopulations are located on rocks, but the lower one is on the rock with a north-western exposure, and the upper one, with an eastern exposure.

The first results of our research indicate a high morphological plasticity of *H. falconeri* and the need for a more detailed study of this issue in other populations and points of the distribution range.

One of the most important methods of preserving rare plants is their cultivation in a protected environment. In this regard, *H. falconeri* has been insufficiently studied. In Kazakhstan, the first living plants were added to the collection of the experimental site “Rock garden” of the botanical

garden of Almaty, Institute of Botany and Phytointroduction in 2017; there it still grows, blooms and bears fruit irregularly [54]. Our experiments on the cultivation of this species began in the fall of 2020 on an individual personal plot in the village Saty (1444 m). The distance from the cultivation point to the place of the species natural growth is about 30 km (Figure 5).

The survival rate of plants transferred from the Taldy gorge (1692 m) was 100%. In 2021, the growing season started on March 20, the beginning of flowering was on March 29, the massive flowering, on April 17, and the end of flowering, on May 23. The total duration of flowering was 55 days, and for one flower, from 17 (first opened, April) to 6 days (last opened, May). Post-generative vegetation continued until autumn snowfall (November). Thus, the studied species is of great interest for landscaping as an ornamental plant due to its early and long flowering (about two months) [55].





**Figure 5** – Location of points of the natural growth  
1 – Taldy gorge and cultivation (2 – village Saty).

## Conclusion

As a result of our own surveys, *H. falconeri* was found both on the northern and southern macroslopes of the Kungei Alatau. Unfortunately, in 2021, the authors failed to find this species in Ketmentau and Dzhungarskiy Alatau indicated in the literature and herbarium specimens, which points to the need for repeated surveys in these regions. The presence of *H. falconeri* in the Zailiyskiy Alatau raises big questions, since it has not been confirmed by any herbarium material.

The study of scattered coenopopulations of *H. falconeri* in the Taldy gorge (northern macroslope of the Kungei Alatau) confirmed that this species is a forest element and belongs to the petromesophyton ecomorph, because it grows from the lower part of the spruce belt to the upper part of the subalpine belt, preferring rocks and gravelly slopes of various steepness and exposition. The lowest mountain population of this species on the Kungey Alatau ridge was found in the lower part of the Taldy river valley (1692 m). In the same gorge, the floristic composition of plant communities with the participation of *H. falconeri* was studied in detail. It comprised 107 species from 46 families. The 13 most species-rich families (Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Rosaceae, Ranunculaceae, Apiaceae, Crassulaceae, Caryophyllaceae, Orchidaceae, Lamiaceae, Geraniaceae, Papaveraceae

and Primulaceae) accounted for 64.5% of all species. The composition of ecobiomorphs was dominated by herbaceous perennials (89 species), followed by tree and shrub species (15 species) and annuals (3 species). The floristic core was formed by 15 species: *Picea schrenkiana*, *Atragene sibirica*, *Ribes meyeri*, *Lonicera stenantha*, *Rosa alberti*, *Sedum hybridum*, *Sedum ewersii*, *Aegopodium alpestre*, *Fragaria vesca*, *Geranium collinum*, *Galium turkestanicum*, *Poa nemoralis*, *Polypodium vulgare*, *Kaufmannia semenovii*, *Rheum wittrockii*, which are, by ecological type, forest, forest-meadow or petro-lithophilic ecological-phytocenotic elements.

We have verified some of the morphological characteristic of *H. falconeri*. Thus, the bracts are formed by three upper sessile, entire stem leaves, and not by 3-4 toothed leaves, as reported in literary sources. In addition, the number of sepals is usually (in 94.5% of cases) six, very rarely (3%), five, and only occasionally, 7-8. It is this morphometric indicator that has a low level of the coefficient of variation and, possibly, is a stable trait for this species.

According to the results of the initial testing of *H. falconeri* in cultivation (in the village Saty), it was found that this species is of great interest for landscaping as an ornamental plant due to its early and long flowering and a long (until late autumn) period of post-generative vegetation when plants retain their decorative effect.



## References

- 1 National strategy and action plan for the conservation and balanced use of biological diversity of the Republic of Kazakhstan. – Kokshetau. – 1999. – P.336.
- 2 The Red Book of Kazakhstan. Volume 2. Part 1. Plants. – Astana. – 2014. – P. 44.
- 3 Rare and endangered species of flora of the USSR in need of protection. Edited by A.L. Takhtajan. L.: Nauka, – 1981. – P. 264.
- 4 Chater A.O., Pawlowski B., Yutin T.G. et al. Ranunculaceae // Flora Europaea. – Cambridge Univ. press, – 1964. – Vol.1. – P. 206-242.
- 5 Grey-Wilson Christopher, Blamey Marjorie. Alpine Flowers of Britain and Europe // London. – 1995. – P. 377.
- 6 Ruksans J. Buried Treasures: Finding and growing the World's Choicest Bulbs // Portland. – 2007. – P. 38.
- 7 Kamelin R.V. Flora of the North of European Russia (in comparison with nearby territories) // – St. Petersburg: Publishing House of the VVM. – 2017. – P. 241.
- 8 Poletiko O.M., Mishenkova A.P. Decorative herbaceous plants of open ground. Handbook on the nomenclature of genera and species // L.: Nauka, – 1967. – P. 208.
- 9 Baumberger H. Chromosomenzahlbestimmung und Karyotypanalysen bei den gattungen Anemone, Hepatica und Pulsatilla // Ber. Schweiz. Bot. ges., – 1970. №80. – S. 17-96.
- 10 Huyn K.L. Le pollen du genre Anemone et du genre Hepatica (Ranunculaceae) et leur taxonomie // Pollen et spores. – 1970. №3. – P. 324-364.
- 11 Barykina R.P., Gulanyan T.A. Morphological and anatomical study of Hepatica nobilis Garsault // Byull. MOIP. Ed. biol. – 1974. Vol. 79. Issue 2. – P. 94-108.
- 12 Slavikova Z. Zur Morphologie der Blütenhülle von Hepatica nobilis // Ibid. A. – 1976. №2. – S. 97-106.
- 13 Rysin L.P., Rysina G.P. Morphostructure of underground organs of forest herbaceous plants // M.: Nauka, – 1987. – P. 208.
- 14 Field geobotany. – M.-L.: Publishing House of the USSR Academy of Sciences. 1964-1971.
- 15 Flora of the USSR. Vv. 1-30. M. – L.– 1934-1964.
- 16 Flora of Kazakhstan. Vv. 1-9. Alma-Ata, – 1956-1966.
- 17 The determinant of Central Asia. Critical Synopsis of flora. Vv. 1-10. – Tashkent. – 1968-1993.
- 18 <https://herba.msu.ru>
- 19 <https://www.plantarium.ru>
- 20 Abdulina S.A. List of vascular plants of Kazakhstan. – Almaty. – 1999. – P. 187.
- 21 Takhtadjan A.L. The system of magnoliophytes. L.: Nauka. – 1987. – P. 439.
- 22 Tamura M. Morphology, ecology and phylogeny of the Ranunculaceae. I // Sci. Rep. Osaka Univ. – 1963. – Vol.11. – P. 115-126.
- 23 Ziman S. I. Morphology and phylogeny of the Buttercup family // Kiev: Naukova dumka. – 1986. – P. 248.
- 24 Jabbour F., Renner S. A phylogeni of Delphinieae (Ranunculaceae) shows that Aconitum is nested wirhin Delphinium and that Late Miocene transitions to long life cycles in the Himalayas and Southwest China coincide with bursts in diversification // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2012. – Vol. 62. – P. 928-942.
- 25 Janchen E. Die systematische gliederung der Ranunculaceae und Berberidaceae // Denkschr. Osterr. Akad. Wis. Math. naturwiss. Kl. – 1949. №4. – S. 1-82.
- 26 Jensen U. Serologische Boitrag zur Systematik der Ranunculaceae // Bot. Jb. Syst. 1968. Bd. 88. – S. 269-310.
- 27 Steward A.N. Hepatica transsilvanica group of Eastern Europe and Asia // Rhodora. – 1927. – Vol. 29. – P. 53-54.
- 28 Steyermark J.A., Steyermark C. Hepatica in North America // Rhodora. 60. №740. – P. 223-232.
- 29 Tamura M. A new classification of the family Ranunculaceae // Acta Phytotax. geobot. – 1990. – Vol. 41. – P. 93-101.
- 30 Hara H., Kurosawa S. Differentiation within Anemone hepatica L. of Japan // J. jap. Bot. – 1958. – Vol. 33. – P. 265-275.
- 31 Tho C.A. A cytotaxonomic study of the H. asiatica and H. maxima in Korea // J. Korean Cult. Inst. Ewha Women's Univ. – 1967. – Vol. 10. – P. 313-320.
- 32 Ogisu M., Awan M.R., Mabuchi T., Mikanagi Y. Morphology, phenology and citology of Hepatica falconeri in Pakistan // Kew Bull. – 2002. – Vol. 57 (4). – P. 948-953.
- 33 Kurita M. Cytological studies in Ranunculaceae. II. The karyotype of Anemone and Hepatica // Bot. Mag. (Tokyo). – 1955. – Vol. 68. – P. 187-190.
- 34 Rield H. New Taxa und Kombinationen in Ranunculaceae from Pakistan und Kaschmir // Kew Bull., – 1979. 34. № 2. – P. 361-366.
- 35 Parsa A. Ranunculaceae // Flora d' Iran (la Perse). Teheran, – 1951. – Vol. 1, № 1. – P. 348-442.
- 36 Hooker J.D. Flora of British India. I. Ranunculaceae to Sapindaceae. – Dehli: Peridical Expertis, – 1973. – Vol.8. – P. 1-740.37.
- 37 Goloskokov V.P. Flora of the Dzungarian Alatau. – Alma-Ata, – 1984. – P. 224.
- 38 Qershli R.A., Chaudhri M.N. Anemone falconeri // Pakistana Syst. – 1988. – Vol. 4 (1-2). – P. 111-112.
- 39 Roldugin I.I. Spruce forests of the Tien Shan (flora classification and dynamics) // Alma-Ata: Nauka. – 1989. – P. 304.
- 40 Nasir Y.J., Rafio R.A. Wild Flowers of Pakistan. Edited by T.J. Roberts // Oxford University Press. Kazachi. – 1995. – P. 298.
- 41 Lazkov G.A., Sultanova B.A. Cadastre of flora of Kyrgyzstan: vascular plants. – Bishkek. – 2014. – P. 125.
- 42 Baitenov M.S. High-altitude flora of the Northern Tien Shan. Alma-Ata, "Science", – 1985. – P. 232.

- 43 Ivashchenko A.A. Treasures of the flora of Kazakhstan. According to the pages of the Red Book. – Almaty: "Almatykitap". – 2007. – P. 128.
- 44 Sadyrova G.A., Shormanova A.A. Rare, endemic and subendemic plant species of the flora of the Ketmen ridge // Almaty. – 2017. – P. 168.
- 45 Kokoreva I.I. Plants of the Dzungarian and Trans-Ili Alatau in need of protection. – Almaty. – 2007. – P. 212.
- 46 Baitulin I.O., Ogar N.P., Nesterova S.G., Inelova Z.A. Flora of the Iseysky Alatau // Almaty: Kazakh University, – 2017. – P.196.
- 47 Popov M.G. Flora of the Almaty State Reserve. – Alma-Ata. – 1940. – P. 50.
- 48 Mukhtubaeva S.K., Nelina N.V., Sitpayeva G.T., Kuudabaeva G.M., Veselova P.V., Bilibayeva B.K., Jumadilova A. Rare endemism, relict and endangered plant species of the northern Tien-Shan (Kungei, Kirgizskiy Alatau) // Reports of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. – 2017. – Vol.6. №316, – P. 103-110.
- 49 Holubec V., Horak D. The Tian Shan and its Flowers. – Prague. – 2018. – P. 404.
- 50 Otradnykh I.G., Sedina I.A., Malybekova B.B., Akhmetov H.A. New places of growth and population features of rare plant species on the territory of the State Scientific Research Enterprise «Kolsai kolderi» // Republican scientific conference "Conservation of biodiversity and rational use of biological resources". – Almaty, 2016. – P. 87-91.
- 51 Thomson T. *Anemone falconeri* // Hooker's Icon Pl. – 1852. №9: – P. 899.
- 52 Yuzepchuk S.V. Genus Liverworm – *Hepatica* Mill. // Flora of the USSR. Vol. 7. M. – L.b. 1937. – P. 282-285.
- 53 Nikolaeva M.G., Razumova M.V., Gladkova V.N. Handbook of germination of dormant seeds. – L.: Nauka, 1985. – P. 348.
- 54 Sitpaeva G.T., Otradnykh I.G., Sedina I.A. Collection of rare plant species of Kazakhstan in the conditions of the botanical garden of Almaty // Problems of botany of Southern Siberia and Mongolia. – 2021. – Vol. 20, No. 1. – P. 404-408.
- 55 Kaparbay R.E., Ivashchenko A.A. Liver of falconera (*Heratica falconeri*) (Thoms.) Steward in Kungey Alatau: study of nature and experience of cultivation // Materials the International Scientific and Practical Conference «Independence of Kazakhstan: Aspects of biodiversity conservation» dedicated to the 80-th anniversary of Doctor of Biological Sciences, Professor, initial member of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Academician KazNANS Mukhitdinov Nashtay Mukhitdinovich. Almaty. 26 November 2021) – Almaty: Ed. Kazakh University, 2021. – P. 86-88.

#### References

- 1 Abdulina S.A. (1999) Spisok sosudistyh rastenij Kazahstana [List of vascular plants of Kazakhstan]. Almaty, p. 187.
- 2 Bajtenov M.S. (1985) Vysokogornaja flora Severnogo Tjan'-Shanja [Alpine flora of the Northern Tien Shan]. Alma-Ata, «Nauka», p. 232.
- 3 Bajtulin I.O., Ogar' N.P., Nesterova S.G., Inelova Z.A. (2017) Flora Ilejskogo Alatau [Flora of Iliyskiy Alatau]. Almaty: Kazak universiteti, p. 196.
- 4 Barykina R.P., Gulanzhan T.A. (1974) Morfologo-anatomicheskoe issledovanie *Hepatica nobilis* Garsault [Morphological and anatomical study of *Hepatica nobilis* Garsault]. Bjull. MOIP. Otd. biol., vol. 79., vyp. 2., pp. 94-108.
- 5 Baumberger H. (1970) Chromosomenzahlbestimmung und Karyotypanalysen bei den gattungen *Anemone*, *Hepatica* und *Pulsatilla*. Ber. Schweiz. Bot. ges, no 80, pp. 17-96.
- 6 Chater A.O., Pawlowski B., Yutin T.G. et al. Ranunculaceae (1964) Flora Europaea. – Cambridge Univ. press, vol.1, pp. 206-242.
- 7 Flora Kazahstana (1956-1966) [Flora of Kazakhstan]. Alma-Ata, Vv. 1-9.
- 8 Flora SSSR (1934-1964) [Flora of the USSR]. M. – L., Vv. 1-30.
- 9 Goloskokov V.P. (1984) Flora Dzhungarskogo Alatau [Flora of Dzhungarskiy Alatau]. Alma-Ata, p. 224.
- 10 Grey-Wilson Christopher, Blamey Marjorie (1995) Alpine Flowers of Britain and Europe. London, p. 377.
- 11 Hara H., Kurosawa S. (1958) Differentiation within *Anemone hepatica* L. of Japan. J. jap. Bot., vol. 33, pp. 265-275.
- 12 Holubec V., Horak D. (2018) The Tian Shan and its Flowers. Prague, p. 404.
- 13 Hooker J.D. (1973) Flora of British India. I. Ranunculaceae to Sapindaceae. Delhi: Perioidal Expertis, vol.8, pp. 1-740.
- 14 <http://herba.msu.ru>
- 15 <https://www.plantarium.ru>
- 16 Huyn K.L. (1970) Le pollen du genre *Anemone* et du genre *Hepatica* (Ranunculaceae) et leur taxonomie. Pollen et spores, no 3, pp. 324-364.
- 17 Ivashchenko A.A (2007) Sokrovishha rastitel'nogo mira Kazahstana. Po stranicam Krasnoj knigi [Treasures of the flora of Kazakhstan. Through the pages of the Red Book]. Almaty: «Almatykitap», p. 128.
- 18 Jabbour F., Renner S. (2012) A phylogeny of Delphinieae (Ranunculaceae) shows that *Aconitum* is nested within *Delphinium* and that Late Miocene transitions to long life cycles in the Himalayas and Southwest China coincide with bursts in diversification. Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 62, pp. 928-942.
- 19 Janchen E. (1949) Die systematische gliederung der Ranunculaceae und Berberidaceae. Denkschr. Osterr. Akad. Wis. Math. naturwiss. Kl., no 4, pp. 1-82.
- 20 Jensen U. (1968) Serologische Beitrage zur Systematik der Ranunculaceae. Bot. Jb. Syst. Bd. 88, pp. 269-310.
- 21 Juzepchuk S.V. (1937) Rod *Pechenochnica* – *Hepatica* Mill. [Genus Liverworm – *Hepatica* Mill.]. Flora SSSR. T. 7. M. – L.b. – pp. 282-285.
- 22 Kamelin R.V. (2017) Flora Severa Evropejskoj Rossii (v sravnenii s bliz lezhashhimi territorijami) [Flora of the North of European Russia (in comparison with adjacent territories)]. SPb: Izd-vo VVM, p. 241.

- 23 Kaparbij R.E., Ivashchenko A.A. (2021) Pechenochnica fal'konera (*Hepatica falconeri* (Thoms.) Steward) v Kungej Alatau: izuchenie v prirode i opyt kul'tivirovaniya [Liver of falconera (*Hepatica falconeri*) (Thoms.) Steward) in Kungej Alatau: study of nature and experience of cultivation]. *Materialy Mezhdunarodnoj Nauchno-Ilrakticheskoy konferencii «Nezavisimost' Kazahstana: Aspekty sohraneniya bioraznoobrazija» posvjashhennaja 80-letiju doktora biologicheskikh nauk, professora, Pochetnogo chlena Nacional'noj akademii Nauk Respybliki Kazahstan, akademika KazNAEN Muhitdinova Nashtaja Muhitdinovicha*. Almaty. 26 nojabrja 2021 g.) – Almaty: Izd. Kazak universiteti, – pp. 86-88.
- 24 Kokoreva I.I. (2007) Rasteniya Dzhungarskogo i Zailijskogo Alatau, nuzhdajushhiesja v ohrane [Plants of the Dzungarian and Trans-Ili Alatau, in need of protection]. Almaty, p. 212.
- 25 Krasnaja kniga Kazahstana (2014) Rasteniya [Plants]. Astana, vol. 2, p. 44.
- 26 Kurita M. (1955) Cytological studies in Ranunculaceae. II. The karyotype of *Anemone* and *Hepatica*. *Bot. Mag. (Tokyo)*, vol. 68, pp. 187-190.
- 27 Laz'kov G.A., Sultanova B.A. (2014) Kadastr flory Kyrgyzstana: sosudistye rasteniya [Flora Cadastre of Kyrgyzstan: Vascular Plants]. Bishkek, p. 125.
- 28 Mukhtubaeva S.K., Nelina N.V., Sitpayeva G.T., Kuudabaeva G.M., Veselova P.V., Bilibayeva B.K., Jumadilova A. (2017) Rare endemis, relict and endangered plant species of the northern Tien-Shan (Kungei, Kirgizskiy Alatau). *Reports of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan*, vol. 6, no 316, pp. 103-110.
- 29 Nacional'naja strategija i plan dejstvij po sohraneniu i sbalansirovannomu ispol'zovaniju biologicheskogo raznoobrazija Respubliki Kazahstan (1999) [National strategy and action plan for the conservation and balanced use of biological diversity of the Republic of Kazakhstan]. Kokshetau, p.336.
- 30 Nasir Y.J., Rafiq R.A. (1995) *Wild Flowers of Pakistan*. Edited by T.J. Roberts. Oxford University Press. Kazachi, p. 298.
- 31 Nikolaeva M.G., Razumova M.V., Gladkova V.N. (1985) *Spravochnik po prorashhivaniju pokojashhihsja semjan* [Handbook of germination of dormant seeds]. – L.: Nauka, – p. 348.
- 32 Ogisu M., Awan M.R., Mabuchi T., Mikanagi Y. (2002) Morphology, phenology and citology of *Hepatica falconeri* in Pakistan. *Kew Bull.*, vol. 57 (4), pp. 948-953.
- 33 *Opredelitel' Srednej Azii. Kriticheskij konspekt flory (1968-1993)* [Keys to Central Asia. Critical synopsis of flora]. Tashkent, Vv. 1-10.
- 34 Otradnyh I.G., S#edina I.A., Malybekova B.B., Ahmetov H.A. (2016) Novye mesta proizrastaniya i populjacionnye osobennosti redkih vidov rastenij na territorii GNPP «Kolsaj kolderi» [New places of growth and population features of rare plant species on the territory of the State Scientific Research Enterprise «Kolsai kolderi»]. *Respublikanskaja nauchnaja konferencija «Sohranenie bioraznoobrazija i racional'noe ispol'zovanie bioresursov»*. – Almaty, pp. 87-91.
- 35 Parsa A. (1951) *Ranunculaceae. Flora d' Iran (la Perse)*. Teheran, vol.1, no 1, pp. 348-442.
- 36 Poletiko O.M., Mishenkova A.P. (1967) *Dekorativnye travjanistye rasteniya otkrytogo grunta. Spravochnik po nomenklature rodov i vidov* [Ornamental herbaceous plants in open ground. Reference book on the nomenclature of genera and species.]. L.: Nauka, p. 208.
- 37 *Polevaja geobotanika (1964-1971)* [Field geobotany]. – M.-L.: Izd. AN SSSR.
- 38 Popov M.G. (1940) *Flora Almatinskogo gosudarstvennogo zapovednika* [Flora of the Almaty State Reserve]. Alma-Ata, p. 50.
- 39 Quershi R.A., Chaudhri M.N. (1988) *Anemone falconeri*. *Pakistana Syst.*, vol. 4 (1-2), pp. 111-112.
- 40 Redkie i ischezajushhie vidy flory SSSR, nuzhdajushhiesja v ohrane. Pod red. A.L. Tahtadzhan (1981) [Rare and endangered species of flora of the USSR in need of protection. Ed. A.L. Takhtadzhan]. L.: Nauka, p. 264.
- 41 Rield H. (1979) *New Taxa und Kombinationen in Ranunculaceae from Pakistan und Kaschmir*. *Kew Bull.*, vol 34, no 2, pp. 361-366.
- 42 Roldugin I.I. (1989) *Elovyje lesa Tjan'-Shanja (flora klassifikacija i dinamika)* [Spruce forests of the Tien Shan (flora classification and dynamics)]. Alma-Ata: Nauka, p. 304.
- 43 Ruksans J. (2007) *Buried Treasures: Finding and growing the World's Choicest Bulbs*. Portland, p. 38.
- 44 Rysin L.P., Rysina G.P. (1987) *Morfostruktura podzemnyh organov lesnyh travjanistyh rastenij* [Morphostructure of underground organs of forest herbaceous plants]. M.: Nauka, p. 208.
- 45 Sadyrova G.A., Shormanova A.A. (2017) *Redkie, jendemichnye i subjendemichnye vidy rastenij flory hrebta Ketmen* [Rare, endemic and subendemic plant species of the flora of the Ketmen ridge]. Almaty, p. 168.
- 46 Sitpaeva G.T., Otradnyh I.G., S#edina I.A. (2021) *Kollekcija redkih vidov rastenij Kazahstana v uslovijah botanicheskogo sada g. Almaty* [Collection of rare plant species of Kazakhstan in the conditions of the botanical garden of Almaty]. *Problemy botaniki Juzhnoj Sibiri i Mongolii*. – T. 20, №1. – pp. 404-408.
- 47 Slavikova Z.Zur (1976) *Morphologie der Blütenhülle von Hepatica nobilis*. *Ibid. A.*, no 2, pp. 97-106.
- 48 Steward A.N. (1927) *Hepatica transsilvanica* group of Eastern Europe and Asia. *Rhodora*, vol. 29, pp. 53-54.
- 49 Steyermark J.A., Steyermark C. *Hepatica in North America*. *Rhodora*, 60. No 740, pp. 223-232.
- 50 Tahtadzhan A.L. (1987) *Sistema magnoliifitov* [Magnoliophyte system]. L.: Nauka, p. 439.
- 51 Tamura M. (1963) *Morphology, ecology and phylogeny of the Ranunculaceae*. I. *Sci. Rep. Osaka Univ.*, vol.11, pp. 115-126.
- 52 Tamura M. (1990) *A new classification of the family Ranunculaceae*. *Acta Phytotax. geobot.*, vol. 41, pp. 93-101.
- 53 Tho C.A. (1967) *A cytotoxic study of the H. asiatica and H. maxima in Korea*. *J. Korean Cult. Inst. Ewha Women's Univ.*, vol. 10, pp. 313-320.
- 54 Thomson T. (1852) *Anemone falconeri*. *Hooker's Icon Pl.*, no 9, p. 899.
- 55 Ziman S.I. (1986) *Morfologija i filogenija semejtva Ljutikovykh* [Morphology and phylogeny of the Buttercup family]. *Kiev: Naukova dumka*, p. 248.

G.A. Sadyrova<sup>1</sup> , T.A. Bazarbaeva<sup>1</sup> , G.A. Mukanova<sup>1</sup>   
D.K. Bayzhigitov<sup>2</sup> , S.M. Jamilova<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Kazakh National University. Al-Farabi, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Kazakh National Pedagogical University. Abay, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: [gulbanu-s@mail.ru](mailto:gulbanu-s@mail.ru)

## SOME FEATURES OF THE HISTORY OF FLORA FORMATION IN THE CHU RIVER VALLEY

The article describes the history of the formation of vegetation and flora of the Chu river valley, its floristic composition and structure by geological periods. According to the results of many years of floristic research, today on the territory of the Chu River valley within Kazakhstan, there are 730 species of vascular plants belonging to 350 genera and 70 families. According to the species composition, the division Magnoliophyta dominates in the studied territory of the Chu River valley, which accounts for 99.3% and 17.6% belongs to Liliophyta. The largest number of species is concentrated in the subclasses Rosidae, Caryophyllidae, Lamiidae, Dilieniidae and Ranunculidae, each of which has families of 1-2 families, abundant genera and species, the rest of the families are represented by a small number. The history of the development of vegetation and flora of the river valley. Chu is only a part of the history of vegetation in Central Asia and Kazakhstan as a single region of major rank. Analysis of paleobotanical spore-pollen spectra of Tertiary and Quaternary deposits showed that the most ancient types of vegetation in the Chu River valley are xerophytic steppe and desert vegetation.

**Key words:** biodiversity, flora, vegetation, valley, Chu river.

Г. А. Садырова<sup>1</sup>, Т. А. Базарбаева<sup>1</sup>, Г. А. Муканова<sup>1</sup>,  
Д. К. Байжігітов<sup>2</sup>, С.М. Жамилова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Абая атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: [gulbanu-s@mail.ru](mailto:gulbanu-s@mail.ru)

### Чу өзенінің алқабының флорасының қалыптасу тарихының кейбір ерекшеліктері

Мақалада Шу өзенінің алқабындағы өсімдіктер мен флораның қалыптасу тарихы, оның флористикалық құрамы және геологиялық кезеңдер құрылымы келтірілген. Жүргізілген көп жылдық флористикалық зерттеулердің нәтижелері бойынша бүгінгі күні Шу өзенінің алқабы аумағында Қазақстан шегінде 350 ұрпаққа және 70 тұқымдасқа жататын тамырлы өсімдіктердің 730 түрі бар. Түрлер құрамы бойынша Шу өзенінің алқабының зерттелген аумағында Magnoliophyta бөлімі басым, оның үлесі 99,3% және 17,6% Liliophyta-ға жатады. Түрлердің ең көп саны Rosidae, Caryophyllidae, Lamiidae, Dilieniidae және Ranunculidae кіші сыныптарында шоғырланған, олардың әрқайсысында 1-2 отбасы, мол ұрпақтар мен түрлер бар, қалған отбасылар аз мөлшерде ұсынылған. Шу өзені алқабының өсімдіктері мен флорасының даму тарихы ірі дәрежедегі бірыңғай өңір ретінде Орта Азия мен Қазақстанның өсімдіктер тарихының бір бөлігі ғана болып табылады. Үшінші және төртінші шөгінділердің палеоботаникалық спора-тозаң спектрлерін талдау Шу өзенінің алқабындағы өсімдіктердің ең көне түрлері ксерофитті дала және шөлді өсімдіктер екенін көрсетті.

**Түйін сөздер:** Биоәртүрлік, флора, өсімдіктер, алқап, Чу өзені.



Г.А. Садырова<sup>1</sup>, Т.А. Базарбаева<sup>1</sup>, Г.А. Муканова<sup>1</sup>,  
Д.К. Байжигитов<sup>2</sup>, С.М. Жамилова<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский национальный педагогический университет им. Абая, г. Алматы

\*e-mail: gulbanu-s@mail.ru

### Некоторые особенности истории формирования флоры долины реки Чу

В статье приводится история формирования растительности и флоры долины реки Чу, ее флористический состав и структура по геологическим периодам. По результатам проведенных многолетних флористических исследований на сегодняшний день на территории долины реки Чу в пределах Казахстана насчитывается 730 видов сосудистых растений, относящихся к 350 родам и 70 семействам. По видовому составу, на исследуемой территории долины реки Чу доминирует отдел Magnoliophyta, на долю которого приходится 99,3 % и 17,6 % относится к Liliophyta. Наибольшее количество видов сосредоточено в подклассах Rosidae, Caryophyllidae, Lamiidae, Dilleniidae и Ranunculidae в каждом из которых имеются семейства по 1-2 семейства, обильными родами и видами, остальные семейства представлены небольшим количеством. История развития растительности и флоры долины р. Чу является лишь частью истории растительности Средней Азии и Казахстана как единого региона крупного ранга. Анализ палеоботанических споро-пыльцевых спектров третичных и четвертичных отложений показал, что самыми древними типами растительности долины реки Чу, являются ксерофитная степная и пустынная растительность.

**Ключевые слова:** Биоразнообразие, флора, растительность, долина, река Чу.

### Introduction

The aim of this work was to study the history of the formation of the flora of the Chu river valley. The study of the history of the formation of the flora of desert territories in recent years is of great scientific interest [1,2,3,4,5]. It is especially important to study the flora of individual, poorly studied regions located in the desert zone, where the flora and vegetation of the floodplains of rivers, terraces, coastal strip are most vulnerable, which in turn is expressed in a significant change in pristine biocenoses, a decrease in the areas and stocks of species populations and even their destruction. One of these regions is the river valley. Chu, which has long been experiencing significant anthropogenic pressure associated with increased economic activity. The Chu River originates from the glaciers and snowfields of the Terskey Alatau and the Kirghiz ridge, formed by the confluence of the Dzhuanyk and Kochkar rivers (in the northern spurs of the Tien Shan) (42°41' N, 75°55' E) slightly west of the lake. Issyk-Kul through the Boam gorge, it enters the plain and, describing a giant arc, carries its waters into the desert [6,7].

Valley of the r. Chu is located in the south of Kazakhstan between the Betpak-Dala desert and the Chu-Ili mountains in the north and the Moyinkum sands in the south. The length of the Chu river valley is about 1186 m (Figure 1).

The headwaters and part of the middle reaches of the Chu River, with almost the entire catch-

ment area, are located in Kyrgyzstan. Within Kazakhstan, the valley stretches for 800 km, part of the middle reaches and the lower reaches of the river. The Chu River below the Furmanovka village splits into a number of channels and forms several extensive floods. Administratively, the lower reaches of the Chu river valley (Furmanov, Ulanbel and Kamkaly) lie in Kazakhstan within two regions – Zhambyl and South Kazakhstan. The territory of the river. Chu with the adjoining Betpak-Dala and the Moyinkum sands belongs to the dry hot zone of deserts, and only the southern and southeastern part (the territory of the Tas-Utkelsky massif) is located in the arid hot zone of the foothills and flattened low mountains. On the territory of the river valley. Chu, there is a contrast in climatic conditions, significant fluctuations in the hydrothermal coefficient, the values of average annual precipitation. The average annual temperature is positive 8-9 ° C. The coldest month is January (- 9 – 10), especially hot – July-August (from +22 to +29). In the spring, the temperature rises rapidly. In the second decade of February and the first decade of March, the snow melts ends [8]. Frosts in the air in the northern part cease on 21. IV, in the southern part 29. IV. The frost-free period lasts 161 days. The average annual precipitation varies from 265-268 mm (Chu-Tolebi) to 170-167-140 mm (Furmanov, Ulanbel, Kamkaly). In summer, the amount of precipitation decreases significantly. In spring, precipitation is 30-42% of

the annual amount, in summer – 12-16%, the rest falls in autumn and winter. The territory of the river Chu is subject to systematic winds through-

out the year (Figure 2). The strongest winds are observed in winter and spring, the speed reaches 2.5-7.6 m / s [8].



Figure 1 – Shu River



Figure 2 – Chu river

## Materials and research methods

In the process of writing the history of the formation of the flora of the Chu river valley, there were sources: “Flora of the USSR” [9], “Trees and bushes of the USSR” [10], “Flora of Kazakhstan” [11], “Trees and bushes of Kazakhstan” [12], “Plants of Central Asia” [13], “Key to Plants of Central Asia” [14], “Illustrated Key to Plants of Kazakhstan” [15], as well as the works of L.Ya. Kurochkina [16, 17, 18], E.P. Korovin [19, 20, 21], B.A. Fedorovich [6], V.I. Eliseev [22], K.V. Nikiforova [23], L.S. Berg [24], E.F. Wulf [25], V.M. Sinitsyn [26], M.M. Ilyin [27], E.D. Zaklinskaya [28, 29], B.A. Bykov [30, 31], M.G. Popov [32], A.N. Krishtofovich [33], V.S. Kornilova [34, 35, 36], E.F. Kutuzkina [37], P.Ya. Abuzyarova [38], Z.A. Svarichevskaya [39], N.N. Kostenko [40]. To clarify the specific and generic names, the latest reports by S.K. Cherepanov [41], S.A. Abdulina [42], A.L. Takhtadzhyan [43].

## Research results and their discussion

As a result of long-term studies of the flora of the Chu river valley, we have identified 730 species belonging to 350 genera and 70 families. Angiosperms form the basis of the flora of the Chu river valley. Flora of angiosperms according to the system of A.L. Takhtadzhyan is represented by 7 subclasses from Magnoliopsida (dicotyledonous) and 3 subclasses from Liliopsida (monocotyledonous). The largest number of species is concentrated in the subclasses Rosidae, Caryophyllidae, Lamiidae, Dilleniidae and Ranunculidae, each of which has families of 1-2 families, abundant genera and species, the rest of the families are represented by a small number. The subclass Asteridae is represented by one polymorphic family, Asteraceae. The smallest number of species is represented in one subclass of dicotyledons (Magnoliidae), and in two subclasses of monocotyledons (Alismidae and Arecidae). In monocotyledonous the majority of species are concentrated in the subclasses Liliidae, in particular in the families *Poaceae*, *Cyperaceae*, *Juncaceae* and *Liliaceae*.

Valley of the r. Chu occupies the eastern part of the vast Chuya depression, the formation of the ancient relief of which is reflected in the works of B.A. Petrushevsky [44], S.S. Shultz [45], V.I. Eliseev [46], K.V. Nikiforova [47] and others. Their brief position is as follows. The formation of the depression belongs to the lower cretaceous [47, 48]. However, the main landforms were laid down in

the Paleozoic, when the areas of depression of the Chuya depression, the large southeastern and small northwestern ones, were mainly determined [49]. The depression is filled mainly with loose mesozoic-cenozoic sediments. Cretaceous deposits are strongly eroded and kept only in the form of a weathering crust on the remnant uplands of the Paleozoic. To a large extent, the depression is filled with paleogene sediments, among which the Upper oligocene red-colored gypsum clays of the Kendyrylyk Formation (according to K.V. Nikiforova) are the most widespread. In the neogen, due to the dominance of denudation and removal processes, deposits are enriched with pebbles, gravel, and debris. These deposits, which received the most widespread development, were united by K.V. Nikiforova [47] into the Andassai formation. Towards the end of the pliocen, in connection with climate change towards cooling and humidification, there is an accumulation of pale-chocolate lacustrine sediments, identified by the same author, in the Kendyrylyk formation. On the border of the neogen and anthropogen, intense tectonic movements begin, the Tien Shan grows, the climate becomes humid, and erosional phenomena intensify.

The alluvial-proluvial deposits of the Kirghiz ridge overlapped with a thick layer from the south a significant part of the ancient surface of the Furmanov (Gulyaev) depression before the penetration of the river. Chu. From the north and north-east, a stratum of coarse proluvial deposits of the Chu-Ili and Kendyktas mountains descended here. The alluvial-proluvial deposits of the northern and southern mountain framing converged at an oblique angle, forming a giant depression from the Ulan-Tumsuk scarp in the southeast to a remnant plateau called Tas-Suek-Oba in the west, which was used by the Chu River, forming its first large intravalley delta. The geomorphological structure and relief of the Chu river valley largely determines the direction of soil formation processes, which contributes to the distribution of river runoff, which is closely related to the history of the development of the valley, which is a series of deltaic expansions of different ages connected by narrow necks. Its formation was carried out by sequential filling with alluvium of the Furmanov, Ulanbel, Kamkaly depressions and took place in several stages. The first area of accumulation of the Chu sediments (stage 1) was the Furmanov depression, vast and deep, which by the time of the penetration of the Chu River was largely filled with alluvial-proluvial drifts from this mountain frame. With a small thickness of the river, lateral



and bottom erosion was insignificant, here the river deposited material brought from the upper reaches. In the middle course, due to the large slopes, the river had greater strength; it cut off the proluvial plain of the Chu-Ili and Kendyktass mountains. The erosion was based on the area of the Karabugut expansion. The bulk of the Chu water flowed into the Furmanov depression, forming the shallow Karabugut lakes. Most of the water was spent on evaporation and transpiration, since the climate did not undergo sharp changes in the Quaternary period [49]. Thus, at the first stage of development, the vast area of the Furmanov spills was an intravalley delta, the head part of which can be traced somewhat below the settlement of Berlik, where the first fork begins – the dried up right-bank channel of the Saksaul-Dala. As the mountains rose, the runoff increased. Due to regressive erosion, the size of the valley increased both in length and in the volume of annual water flow. The increasing mass of water of solid suspensions could no longer fit in the Furmanov delta and two branches of the Saroi and Kazykty branches, penetrated into the Ulanbel depression (2nd stage), where it formed a new Ulanbel delta. The river outburst caused geomorphological restructuring above the formed valley.

Due to the lowering of the groundwater level, significant areas were prone to drying out and desertification, the right-bank alluvial plain of Saksaul-Dala got lost. The next third stage of the formation of the valley is associated with the penetration of the river. Chu into the Kamkaly depression and the formation of the next Kamkaly delta. The new basis of erosion caused the formation of another terrace above the floodplain in the previously formed valley. This terrace (1 above the floodplain) is narrow and fragmentary; it is compressed on the Tas-Utkel massif and in the head of the Ulanbel spills, at the exit from the Kazykty mouth. The penetration of the Chu into the area of the final runoff (stage 4), after filling the shallow Kamkaly depression, proceeded smoothly almost simultaneously with the Kamkaly depression, without causing changes in the relief above the formed valley; therefore, no terraces are observed in the Kamkaly floods. Large remnant islands, composed of paleogene rocks, rise above the flat surface of the scattered floodplain of channel channels [49]. M.A. Orlova [49], summarizing all available information on paleogeology and calculating the time of filling the depressions, concludes that the Chu river penetrated into the Furmanov basin in the neopleistocen (1st stage) about 130 thousand years ago, that is 96% of the entire time, the activ-

ity of the river was aimed at filling the Furmanov (the old name of the Gulyaev) hollow with alluvium. After filling the Furmanov depression, the river with two branches – the Saroi and Kazykty, skirting the Tas-Suek-Oba plateau, broke through into the Ulanbel and then into the Kamkaly shallow depressions. Having reached the territory of the modern final flow (the area of Lake Ashchikol), the river, according to M.A. Orlova turned out to be dammed by the keltiminar deposits of the Syr-Darya, which had formed long before the Chu river penetrated here and had a slope of about 0.000022 from the Syr -Darya towards the lower reaches of the Chu river and the Sarysu alluvium. Thus, the most ancient sediments of the Chu River valley in the lower reaches were formed in the Furmanov spills. Modern landforms are mainly formed by the activity of the river, which branches into a mass of branches in the areas of wide parts of the floodplain and merges into one or two channels in places of its narrowing.

The history of the formation of the flora of the Chu river valley is associated with the uplift of the Buruntau mountains and adjacent parts of the Eastern Betpak-Dala upland, as well as with the uplift of the Kirghiz and Karatau ranges. The uplift of these mountains in the Paleogene epoch led to a reduction in the water surface of the Tethys Sea and, consequently, increased climate aridization [47]. According to geologists [48], the northern arcs of the Tien Shan are characterized by continental deposits, which indicates the long existence of land in this region. As noted by V.M. Sinitsyn [26], in the paleogene era, the Tien-Shan was already a highland with clearly marked blocky ridges and intermontane depressions. However, the general hypsometric level of the country in the paleogene was 2-3 times lower than the present one. At the same time, peripheral depressions open to the Turan plains (Fergana, Angren, Chui and others) were flooded by the sea.

The history of the development of vegetation in the valley of the river. Chu is only a part of the history of vegetation in Central Asia and Kazakhstan as a single region of major rank. Paleobotanical remains of that time from the territory of the Northern Tien-Shan and the Chu river valley are absent, and the complex of flora can be judged from the burials found in a number of places in Central Asia and Northern Kazakhstan, including both plant remains and data from spore-pollen complexes. Thus, according to the numerous data on the Late Cretaceous floras [15, 45], as well as according to the spore-pollen analysis of the Cretaceous strata [23], it can be assumed that in the upper cretaceous, up to the



paleogene borders, the territory of Central Kazakhstan, including the Betpak-Dala desert and the adjacent valley of the river. Chu was still in the zone of influence of the vast Tethys Sea. In this area with a humid and warm climate, rich subtropical flora was developed, which contained a large number of ferns, conifers and ancient angiosperms. As noted by V.M. Sinitsyn [22] the upper cretaceous dinosaurs were accompanied by crocodiles and aquatic turtles, whose remains in places form whole layers of bone-bearing breccias. The earliest mammals, dinocerates and creodonts, appeared on the border with the paleogene. Already at the end of the cretaceous, when the temperature began to drop to 8-6, at which reptiles lose their activity and even stop moving, giant representatives of this class, most characteristic of the mesozoic fauna, begin to die out quickly, in the paleogene they are replaced by warm-blooded mammals, able to withstand significant fluctuations in ambient temperature. In the early paleogene, on the territory of Betpak-Dala and adjacent regions of Central Asia, the subtropical Poltava flora of the savanna type dominated in upland areas and of the type of island forests in depressions. This is confirmed by the data of the analysis of the spore-pollen spectrum of the lower sediments [28] which indicate that a rich subtropical flora of the xerophytic type existed in the oligocene. According to paleobotanical data the first desert elements – *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Caryophyllaceae*, *Limoniaceae*, *Rosaceae*, *Ephedra*, *Haloxylon*, *Artemisia* and others – appeared on the territory of South Kazakhstan by the end of the eocen, where their role increased even more in the oligocene [28]. In our opinion, according to the studies of E.P. Korovin [19], B.A. Bykov [30], E.M. Lavrenko [50] on the territory of the river valley. Chu species of the following genera could have survived as relicts: *Calligonum*, *Artrophytum*, *Ephedra*, *Ijinia*, *Zygophyllum* and others. At the same time, at the end of the cretaceous and at the beginning of the Tertiary period, the penetration of northern Turgai type settlers into the territory of Kazakhstan begins. One of the first waves of boreal flora took place in the first half of the Tertiary. As noted by V. M. Sinitsyn [22], the change of floras took place in connection with the cooling and the manifestation of sharper zoning. The composition of the Turgai flora was more or less uniform throughout the warm temperate zone. In the historical development of the faunas of the Paleogene, the transition of the leading role from the forest fauna at the beginning of the period to the fauna of open spaces at the end of the period is noted. According to the data of

M.G. Popov [32], M.M. Ilyin [27], E.M. Lavrenko [47] in the middle of the Tertiary period, due to the reduction of the ancient Tethys sea, climate aridization occurs, where the deserts of Turan, Western Asia, partly Mongolia and Kashgaria. At the beginning of the neogen, on the basis of mesophilic elements and the modernization of the Poltava flora preserved in the composition of the oligocene flora, the ancient Mediterranean flora was formed. In the course of the miocene, the ancient Mediterranean flora gradually acquired a xerophilous appearance, where the xerophilic desert flora then developed. Hence, it can be assumed that from the deserts of Turan and Central Asia there was a settlement on the territory of the valley of the river. Chu Turanian and Central Asian species. In the upper paleogene-oligocene, there are also no plant remains directly related to the region of the Northern Tien Shan [51]. In relation to the valley of the river. Chu there are materials on the fossil fauna mainly related to the territory of the river valley. Chu from the northwest and northeast. Spore-pollen spectra are known for vegetation of the upper oligocene and lower miocene in the regions of the southeastern Betpak-Dala. Thus, in the flora of the Chu-Sarysu depression and Betpak-Dala, the remains of which were collected in the Aquitanian deposits of the Askazansor suite (upper oligocene) south of the Ak-oi depression in the southeastern part of Betpak-Dala, wood remains, spores and pollen were found: *Abies* – 1, *Picea* -16, *Pinus* -33, *Betula* – 11, *Alnus* -1, *Artemisia* – 1, other forbs – 1 grain [46]. According to E.D. Zaklinskaya [28,29] the pollen of woody species is 90,9%, non-woody species – 9,1%. Judging by the list of pollen and spores given in the work, it can be seen that the upper oligocen is characterized by a predominance of angiosperms of the Turgai broad-leaved flora, but still with a rather large participation of rigid-leaved evergreen flora. Summing up the results of the study of the oligocene flora E.P. Korovin [20] comes to the conclusion that on the same territory, side by side, there were various flora with their heredity and in their own way adapted to the habitat conditions: Turgai forest and Turkmen (Poltava) xerophilous. For a long time these floras were the sources from which nature drew material for the autochthonous development of Central Asia. The composition of the fauna, according to V.I. Eliseev [22] combines elements of the middle and upper oligocen, and partly the miocene (Askazansor) fauna. So, along the right bank of the Chu, on the highlands of the eastern Betpak-Dala, in pebble and cross-bedded sands, remains of bones and teeth were collected, among

which E.I. Belyaeva [22] identified: *Indricotheriidae*, *Allaceropinae*, *Enteldonidae*, *Anthracotheiidae* and *Hyaenodontidae*. As noted by V.I. Eliseev: “the structure of the skeleton of the listed animals allows the assumption that they ate the leaves of trees, from which we can conclude that there were forests in the territory under consideration in the upper oligocene. However, the forests, apparently, did not cover the investigated territory with a continuous cover, among them there were also open spaces necessary for the habitation of *Allaceropinae*, the structure of the skeleton of which suggests that they were good runners” [22]. The spore-pollen complex of the Tortonian deposits in the middle miocene, according to E.D. Zaklinskaya [28,29] is characterized by the presence of a steppe complex of vegetation with a predominance of pollen from non-wood species. Herbaceous species include pollen *Artemisia*, *Ephedra*, *Poaceae*, *Apiaceae*, *Chenopodiaceae*, *Asteraceae* and a group of forbs. The pollen of tree species is no more than 10-15%, and contains the genera *Pinus*, *Picea*, *Taxodium*, single *Betula*, *Alnus*, *Ulmus*.

Thus, the above spore pollen analysis of Tortonian deposits showed that mesophilic tree species begin to disappear in the middle of the miocene, and instead of forest formations, herbaceous cenoses appear, which consist of grasses, wormwood, and others. The territory of Betpak-Dala and the adjacent valley of the Chu river during the miocene is a treeless space, with a predominance of vegetation of the steppe and semi-desert type, with separate island forests along the river banks. And, as noted by E.P. Korovin [21] treeless plains continue to exist in the pliocene. Starting from the middle of the miocene, the climate shifted towards cooling, which resulted in the ancient glaciation of the quaternary period. Until that time, most of Europe was occupied by the Poltava flora of deciduous elements [25,33]. However, by the time of glaciation, the Turgai cold-resistant species displaced the Poltava flora to the west and southwest, and a uniform type of flora was established throughout Northern Eurasia. In the second half of the tertiary – neogen, an intensive uplift of the Tien Shan takes place. Not only its geomorphological appearance is changing, but also the climate. The fossil flora of the Tien Shan is of great interest, since it is a direct witness, allowing one to imagine the ways of the formation of the modern flora and vegetation of the Chu river valley. Plant remains of this time are known from various intermontane depressions of the Central and Eastern Tien-Shan (Kochkor, Issykul, Karkarinsk, Tekes).

Thus, in the generalized list of V.S. Kornilova [35] from the Middle Miocene occurrences of the Kochkor depression along the banks of the Chon-Tuz and Kichik-Tuz rivers, E.F. Kutuzkina [37] established the following species for this locality: Gramineae gen. et. sp. indet., *Potamogeton miralibis* Kutuz., *Potamogeton* sp., *Phragmites oeningensis* A. Br, *Populus nigra* L., *P. praeaeuphratica* Kutuz., *P. pruinoza* Schrenk, *Salix* of. *argyraceae* Wolf, *S. densinervis* Kutuz., *Ulmus carpinoides* Goeppl., *Ulmus* sp., *Trap* asp., *Fraxinus* sp., *Lonicera* sp., *Acer* of. *turkestanicum* pax. In the same deposits of R. Ya. Abuzyarova [143] a spore-pollen complex was isolated (in%): Lycopodiaceae, Polypodiaceae, Filicales no more than 0.3; *Abies sibirica* – 3,5; *Picea* sect. *Eupicea* – 1-2; *Pinus* s/g, *Haplomyxon* – 14-40; *Diploxylon* – 0,5-1; *Ephedra* sp. – 0,5, *Salix* sp. – 1, *Alnus* sp. – 0,5, *Betula* sp. – 15, *Carpinus* sp. – 0,5-1, *Ulmus* sp. – 4-12, *Ulmaceae* – 0,5-1,5, *Celtis* – 0,5, *Magnolia* sp. – 0,5-1,5, *Acer* sp. – 0,3, *Tilia* sp. – 1-3, *Quercus* sp. – 0,5 -1, *Juglans* sp. – 0,5-6,5, *Ericaceae* – 1 -2,5; *Rhododendron* sp. – 0,4; *Lonicera* sp. – 0,5; *Gramineae* – 0,5; *Caprifoliaceae* – 0,5, *Typha* sp. – 0,5; *Phragmites* sp. – 0,3; *Chenopodiaceae* – 0,5; *Sparganium* sp. – 0,5-3,0.

By the end of the Pliocene, in connection with climate changes towards cooling, intensive tectonic movements began on the border of the neogen and the anthropogen. The Tien-Shan grows, and apparently, at this time, as a result of endogenous forces, a number of second-order depressions are formed: Furmanov (vast and deep), Ulanbel (narrow and shallow), Kamkaly with large differences in relief [52]. According to the data of Z. A. Svarichevskaya [39], at the border of the pliocene and the quaternary time, the Saroi depression (area of subsidence) is formed, which, as will be seen later, was used by the r. Chu on a breakout. Towards the end of the pliocene (at the border with the quaternary), along with the growth, the Tien-Shan glaciation occurs [36,40]. The climate became so humid that the lake basins began to overflow and overflow their waters one into another, which further contributed to the formation of the river network. There was an increase in erosional phenomena. Friable material accumulates, especially along the mountains. The spore-pollen spectrum of the Akchagyl and Apsheron deposits, dating back to the upper pliocene age, indicates that at the end of the neogen, xerophilic forms prevailed in the vegetation, but some relics of more moisture-loving plants were preserved. Thus, E.D. Zaklinskaya [28] spore-pollen analysis of Akchagyl deposits showed the

predominance of steppe herbaceous vegetation and forbs, constituting 98%, while the pollen of tree species is 2% and is represented by single grains. As a result of the spore-pollen analysis of the Quaternary and Upper Miocene sediments in the area of the lake. Kamkaly-Kol and Bural-kenyntuz in the north of the southeastern part of the Chu-Sarysu depression, it was found that, starting from the Middle Absheron, throughout the entire period of accumulation of sediments, the spore-pollen spectra repeatedly change their character, which is a reflection of rhythmic changes in natural conditions in the northern parts of Eurasia. It should be noted that the structure of the earth's surface and all the main elements of its reliefs in the quaternary period begin to approach modern ones, and, therefore, the conditions of the continental climate prevail everywhere. With the glacial epoch, writes I.M. Krashennikov [54], a lake-river regime arises and, accordingly, forest vegetation develops. Xerophytic vegetation retreats to the south, spreading interglacial dry ages.

Thus, as a result of tectonic processes of post-glacial accumulation by the Neopleistocen, a surface was formed, the modeling of which determined the direction of the R. Chu and the outline of its valley. Obeying the general law of the dynamics of the earth's surface, the river has done a great job of leveling the ancient relief. Destroying the rocks of mountain structures, it carried out the material and filled them with the most lowered areas of the ancient plains [53]. The influence of the floodplain-alluvial regime, as well as the vegetation of the watersheds of the Moyinkum sands and the Betpak-Dala desert, created conditions for the formation of the flora of the Chu river valley.

As for the history of the development of flora in the Quaternary period on the territory of the Chu river valley, there are materials of paleobotanical studies of the intermontane depressions of the northern Tien-Shan. V.S. Kornilova [35] two localities were established, where one of the localities of the fossil flora was found in the Boam Gorge of anthropogenic age, and the second location, this burial of plant remains was found on the southern bank of the Issyk-Kul near the mouth of the Akterek river. Thus, in the upper section of the Boam gorge, on both banks of the Chu river, quaternary astracodes and gastropods, the jaw of a large deer – *Megaloceras* and a fern imprint – *Onoclea sensibilis* L, as well as imprints of bog plants were found. From plant residues: Monocotyledoneae – 12.6%; *Sparganium* sp. – 3%, *Potamogeton plicocenicum* – 6%, *Myrio-*

*phyllum boamicum* Korn. – 44%. As can be seen from the spore-pollen spectrum, the flora from the Boam gorge from the middle anthropogenic deposits is represented by the remains of coastal water and submerged herbaceous plants, composed of fossil forms of modern species. Hence, it can be assumed that the meadow-bog vegetation of the river valley. Chu descended from the mountains of the Northern Tien Shan. V.I. Zauer [23] isolated the pollen of taxa *Chenopodiaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cruciferae*, *Umbelliferae*, *Artemisia* from the sediments of the upper anthropogen in the Saroi depression and the lower reaches of the Chu river, of which haze pollen prevailed. Pollen analysis of the Saroi formation from the Saroi Basin, according to the data of Z. I. Gurieva [23] showed the presence of steppe semi-desert vegetation. As noted by V.S. Kornilova [36] tree species were not found, since in the era of the upper anthropogen here, as well as on a larger area of flat Kazakhstan, apparently, treeless spaces were already undividedly dominated.

### Conclusion

Thus, paleobotanical spore-pollen spectra of tertiary and quaternary deposits showed that the most ancient types of vegetation in the valley of the river. Chu, are xerophytic steppe and desert vegetation. Their roots go back to the Paleogen, where, with the reduction of the Tethys Sea, the deserts of Turan, Iran and Central Asia arise, from where the Turanian and Central Asian species began to settle. Found remains of *Populus*, *Tamarix*, *Haloxylon*, *Callygonum* and others indicate that in the valley of the river. Chu, at the end of the Tertiary period, tugai forests already existed. As noted by B.A. Bykov [31] tugai forests and light forests, especially along the rivers of South Kazakhstan, are associated with the former savannah. Turanga forests are formed by special poplars from the Turanga desert section (*Populus diversifolia*, *P. pruinosa*), oak tree (*Elaeagnus oxycarpa*), silver shengil shrubs (*Halimodendron halodendron*), comb beetles (*Tamarix ramosissima*, *T. laxcium*), lyceum, clematis (*Clematis orientalis*) and others. In addition to the physical and geographical factors of the environment, human activities influenced the formation of the flora of the Chu river valley. It is known that the valley of the Chu river stood in the way of the movement of caravan routes, which connected the southern cities with settlements of Central Kazakhstan, where cultural and trade relations between Central Asia and Siberia were carried out. Also, the activity of farmers,

plowing the most fertile areas of the middle part of the Chu river valley, had no less influence on the impoverished flora of the valley, in addition, the Chu river valley has long been a pasture for winter grazing, which explains the significant presence of weed species in the flora.

### References

- 1 Peter B. Heenan, Matt S. McGlone. (2019) Cenozoic formation and colonisation history of the New Zealand vascular flora based on molecular clock dating of the plastid *rbcL* gene (New Zealand Journal of Botany). Vol. 57. Issue 4 pp. 204-226.
- 2 Robert W. Gess & Cyrille Prestianni. (2021) An early Devonian flora from the Baviaanskloof Formation (Table Mountain Group) of South Africa. (Sci Rep) vol. 11, 11859. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90180-z>.
- 3 Edwards, D., Morris, J. L., Richardson, J. B. & Kenrick, P. (2014) Cryptospores and cryptophytes reveal hidden diversity in early land floras. (New Phytol.) vol. 202. pp. 50–78.
- 4 Gerrienne, P., Bergamaschi, S., Pereira, E., Rodrigues, M.-A.C. & Steemans, P. (2001). An Early Devonian flora, including *Cooksonia* from the Paraná Basin (Brazil). (Rev. Palaeobotany Palynol.) vol. 116, pp. 19-38.
- 5 Kraft, P., Psenicka, J., Sakal, J. & Fryda, J. (2019). Initial plant diversification and dispersal event in upper Silurian of the Prague Basin. (Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.) vol. 514, – pp. 144–155.
- 6 Fedorovich B.A. (1952). Drevniye reki v pustynyakh Turana [Ancient rivers in the deserts of Turan]. Materialy po chetvertichnomu periodu SSSR. V. 3: 69-102.
- 7 Shchukin I.S. (1964). Obshchaya geomorfologiya. [General geomorphology]. v. 2. -364 p.
- 8 Pochvy doliny reki Chu (1972) [Soils of the Chu river valley], Alma-Ata, – 327 p.
- 9 Flora of the USSR (1934 – 1964) [Flora SSSR]. M.:L., vol. 1– 30.
- 10 Derev'ya i kustarniki SSSR (1966) [Trees and shrubs of the USSR], Moskva, 637 p.
- 11 Flora Kazakhstana (1956-1966) [Flora of Kazakhstan], Alma-Ata, vol. 1 – 9.
- 12 Derev'ya i kustarniki Kazakhstana (1966) [Trees and shrubs of Kazakhstan], Alma-Ata, vol. 1-2-9.
- 13 Rasteniya Tsentral'noy Azii (1963 -1989) [Plants of Central Asia], M.:L., vol. 1 – 9.
- 14 Opredelitel' rasteniy Sredney Azii (1968 – 1993) [The determinant of plants in Central Asia], Tashkent, vol.1-10.
- 15 Illyustirovannyi opredelitel' rasteniy Kazakhstana (1962 – 1975) [Illustrated determinant of plants of Kazakhstan], Alma-Ata, vol. 1 – 2.
- 16 Kurochkina L. Ya. (1966) Rastitel'nost' peschanykh pustyn' Kazakhstana [Vegetation of sandy deserts of Kazakhstan], Alma-Ata, vol. 1. pp. 191-586.
- 17 Kurochkina L. Ya., Osmanova L. T. (1973) Pastbishcha peschanykh pustyn' Kazakhstana [Pastures of sandy deserts of Kazakhstan]. Alma-Ata, – 204 p.
- 18 Kurochkina L. Ya. (1978) Psammofil'naya rastitel'nost' pustyn' Kazakhstana [Psammophilic vegetation of the deserts of Kazakhstan]. A., -270 p.
- 19 Korovin E.P. (1961-1962) Rastitel'nost' Sredney Azii Yuzhnogo Kazakhstana [Vegetation of Central Asia in South Kazakhstan]. M.:Tashkent, – 472 p.
- 20 Korovin E.P. (1934) Ekologicheskiye tipy pustyn' Sredney Azii i Kazakhstana v perspektivakh i ikh khozyaystvennogo osvoeniya. [Ecological types of deserts of Central Asia and Kazakhstan in the prospects and their economic development]. Economic development of the deserts of Central Asia and Kazakhstan. L, pp. 5-20.
- 21 Korovin E.P. (1923) Kompleksnaya ekspeditsiya v pustynyu Betpak-Dala Tsentral'nogo Kazakhstana [Complex expedition to the Betpak-Dala desert of Central Kazakhstan]. // National economy of Kazakhstan. № 11-12.
- 22 Eliseev V.I. (1959) Glavneyshiy osobennosti chetvertichnykh (antropogenovykh) otlozheniy Severo-Vostochnoy pribortovoy chasti Chuyskoy vpadiny [The main features of the Quaternary (Anthropogenic) deposits of the North-Eastern part of the Chuya depression]. Izv. AN Kaz. SSR, seria geol. № 10.
- 23 Nikiforova K. V. (1960) Kaynozoy golodnoy stepi Tsentral'nogo Kazakhstana [Cenozoic hungry steppe of Central Kazakhstan]. Tr. geol. in-that. Academy of Sciences of the USSR. 45. – 260 p.
- 24 Berg L.S. (1953) O problematichnom usykhanii stepey i pustyn' [On the problematic drying up of steppes and deserts]. // Izv. USSR Academy of Sciences, geographer series. M., 5: pp. 5-13.
- 25 Wulf E.F. (1944) Istoricheskaya geografiya rasteniy [Historical geography of plants]. Istoriya flor zemnogo shara. M.:L., -545 p.
- 26 Sinitsyn V.M. (1962) Paleografiya Azii [Paleogeography of Asia]. M.:L., – 178 p.
- 27 Ilyin M. M. (1937) K proiskhozhdeniyu flory pustyn' Sredney Azii. [On the origin of the flora of the deserts of Central Asia]. Sovet. Botanika, № 6. pp. 45-86.
- 28 Zaklinskaya E. D. (1953) Materialy k istorii flory i rastitel'nosti paleogena Severnogo Kazakhstana v rayone Pavlodarskogo Priirtysh'ya [Materials for the history of flora and vegetation of the Paleogene of Northern Kazakhstan in the Pavlodar Priirtysh region]. Trudy inst-ta geol. nauk AN SSR, ser. geol. M., 141 (58).
- 29 Zaklinskaya E.D. (1958) Tipy sporo-pyl'tsevykh spektrov paleogenovykh otlozheniy razlichnykh fiziko-geograficheskikh provintsiy [Types of spore-pollen spectra of Paleogene deposits of various physical-geographical provinces]. Materials on the history of flora and vegetation of the USSR, M., L., vol. 3.



- 30 Bykov B.A. (1978) Ocherki rastitel'nogo mira Kazakhstana i Sredney Azii. [Essays on the flora of Kazakhstan and Central Asia]. Alma-Ata, – pp. 5-14.
- 31 Bykov B.A. (1966) Obshchiy analiz pustyn' Turanskoy nizmennosti [General analysis of the deserts of the Turan lowland]. Structure and productivity of the plant desert zone of Kazakhstan. Nauka, 1:3-36.
- 32 Popov M.G. (1927) Osnovnyye cherty istorii razvitiya flory Sredney Azii [The main features of the history of the development of the flora of Central Asia]. SAGU. №15.
- 33 Krishtofovich A.N. (1955) Razvitiye botaniko-geograficheskikh oblastey severnogo polushariya s nachala tretichnogo perioda [Development of botanical-geographical regions of the northern hemisphere since the beginning of the Tertiary period]. Problems of geology of Asia. M., – 278 p.
- 34 Kornilova V.S. (1961) Ob antropogenovykh florakh iz gornyykh oblastey Sredney Azii [Plant remains from the Neogene sediments of the Kungey Alatau]. Materials on the history of fauna and flora of Kazakhstan. 3: 74-83.
- 35 Kornilova V.S. (1963) Ob antropogenovykh florakh iz gornyykh oblastey Sredney Azii [About anthropogenic flora from the mountainous regions of Central Asia] Materials on the history of fauna and flora of Kazakhstan. A., 4:113-135.
- 36 Kornilova V.S. (1966) Ocherki po istorii flory i rastitel'nosti Kazakhstana [Essays on the history of flora and vegetation of Kazakhstan] Vegetation cover of Kazakhstan. A-Ata., -365p.
- 37 Kutuzkina E.F. (1957) Materialy po verkhnetretichnoy flore Kirgizii. [Materials on the Upper Tertiary flora of Kyrgyzstan] Collection in memory of A. N. Krishtofovich. M.:L.,- pp. 259-275.
- 38 Abuzyarova P. Ya. (1966) [Neogene flora of mountainous regions of Central Asia and South Kazakhstan]. Significance of palynological analysis for stratigraphy and paleofloristics. A., – pp. 165-167.
- 39 Svarichevskaya Z. A. (1961) Drevniy peneplen Kazakhstana i osnovnyye etapy yego preobrazovaniya. [Ancient peneplain of Kazakhstan and the main stages of its transformation]. L., – 275 p.
- 40 Kostenko N.N. (1956) Kratkaya kharakteristika chetvertichnykh otlozheniy Vostochnogo Kazakhstana [Brief characteristics of the Quaternary deposits of East Kazakhstan] Sovet. geol. 52:141-152.
- 41 Cherepanov S.K. (1995) Sosudistyye rasteniya Rossii i sopredel'nykh gosudarstv, v predelakh byvshego. SSSR [Vascular plants of Russia and neighboring states, within the former USSR], SPb., 990 p.
- 42 Abdulina S.A. (1998) Sosudistyye rasteniya Kazakhstana [Vascular plants of Kazakhstan], Almaty, 188 p.
- 43 Takhtadzhyan A.L. (1987) Sistema magnoliofitov [Magnoliophyte system], L., 439 p.46.
- 44 Petrushevsky B. A. (1942) Chuyskaya mul'da i zapadnaya chast' Betpak-Daly [Chuiskaya trough and the western part of Betpak-Dala]. Izv. AN. KazSSR. Ser. geol. 5:53-74.
- 45 Schultz S.S. (1948) Analiz noveyshey tektoniki i rel'yef Tyan'-Shanya. [Analysis of the latest tectonics and relief of the Tien Shan]. M., 134 p.
- 46 Eliseev V.I. (1959) Glavneyshiy osobennosti chetvertichnykh (antropogenovykh) otlozheniy Severo-Vostochnoy pribor-tovoy chasti Chuyskoy vpadiny. [The main features of the Quaternary (Anthropogenic) deposits of the North-Eastern part of the Chuya basin]. Izv. AN Kaz. SSR. seria geol.10: 127-148.
- 47 Nikiforova K. V. (1960) Kaynozoy golodnoy stepi Tsentral'nogo Kazakhstana [Cenozoic hungry steppe of Central Kazakhstan]. Tr. geol. in-that. Academy of Sciences of the USSR. 45:170-186.
- 48 Berg L.S. (1953) O problematichnom usykhaniy stepey i pustyn' [On the problematic drying up of steppes and deserts] Izv. USSR Academy of Sciences, geographer series. M., 5:5-13.
- 49 Orlova M.A. (1971) Geomorfologicheskoye rayonirovaniye [Geomorphological zoning]. Soils of the valley of the r. Chu. Alma-Ata., pp. 23-40.
- 50 Lavrenko E.M., Nikolskaya N.I. (1963) Arealy nekotorykh tsentral'noaziatskikh i severoturanskikh vidov pustynnykh rasteniy i vopros o botaniko-geograficheskoy granitse mezhdru Sredney Aziyey i Tsentral'noy Aziyey [Areas of some Central Asian and North Turanian species of desert plants and the issue of the botanical-geographical border between Central Asia and Central Asia] Botanical journal. 48 (12):1741 – 1761.
- 51 Baytenov M.S. (1985) Vysokogornaya flora Severnogo Tyan'-Shanya [Alpine flora of the Northern Tien Shan]. Alma-Ata., -207 p.
- 52 Orlova M. A. Sokolenko E. A. (1963) Problema osvoyeniya reki Chu. [The problem of the development of the Chu river]. Izv. AN Kaz SSR. series of biol. Issue 2.
- 53 Orlova M. A., Akhanov Zh. U., Kornienko V. A. (1971) Osobennosti pochvoobrazovaniya v doline reki Chu [Peculiarities of soil formation in the Chu river valley]. // Soils of the Chu river valley. A., pp. 135-167.
- 54 Krashennikov I. M. (1925) Rastitel'nyy pokrov Kirgizskoy Respubliki. [Vegetation cover of the Kyrgyz Republic]. Orenburg, -104 p.



2-бөлім  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

Section 2  
**BIOTECHNOLOGY**

---

Раздел 2  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

R. Aipova<sup>1\*</sup> , E.T. Tazabekova<sup>2</sup> , A.A. Kurmanbayev<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>National Center for Biotechnology, Kazakhstan, Nur-Sultan

<sup>2</sup>Kazakhstan-Belarus Center Scientific and Technical Cooperation,  
Eurasian National University named after L.N. Gumilev. Kazakhstan, Nur-Sultan

\*e-mail: Rakhilya\_73@mail.ru

## RESEARCH OF THE PROPERTIES OF PHOSPHATMOBILIZING BACTERIA PERSPECTIVE FOR INCREASING THE PRODUCTIVITY OF AGRICULTURAL GRAINS

Phosphorus is one of the main nutrients that ensure the formation of high and stable crop yields with a favorable quality of marketable products. One of the promising directions for improving the phosphorus nutrition of agricultural crops is biological phosphate mobilization with the help of soil microorganisms, which contributes to the transfer of sparingly soluble phosphorus compounds from the soil and fertilizers into a form accessible to higher plants. Aboriginal soil phosphate mobilizing bacteria were isolated from the rhizosphere soil of the northern region of the Republic of Kazakhstan. Of the five phosphate mobilizing bacteria: *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr, *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c, *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr, *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr, three strains were selected: *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr, *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr, with high soil phosphate mobilization activity. The properties of phosphate-mobilizing bacteria have been studied, their ability to stimulate plant growth and convert insoluble tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  into a form accessible to plants has been established. The ability to phosphate mobilization and stimulation of plant growth determines the positive effect of the introduction of phosphate mobilizing bacteria on crop yields.

The selected strains of phosphate-mobilizing bacteria are promising as a basis for creating a complex biological fertilizer for a wide range of agricultural crops.

**Key words:** phosphate mobilization, soil, bacteria, growth stimulation, wheat seeds.

Р. Аипова<sup>1\*</sup>, Е.Т. Тазабекова<sup>2</sup>, А.А. Курманбаев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ұлттық биотехнология орталығы, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

<sup>2</sup>Қазақстан-Беларусь ғылыми-техникалық ынтымақтастық орталығы,  
Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

\*e-mail: Rakhilya\_73@mail.ru

### Ауыл шаруашылығы дақылдарының өнімділігін арттыру үшін перспективті фосфатмобилизациялаушы бактериялардың қасиеттерін зерттеу

Фосфор тауарлық өнімдердің қолайлы сапасымен жоғары және тұрақты ауыл шаруашылығы дақылдарының өнімін қалыптастыруды қамтамасыз ететін негізгі қоректік заттардың бірі болып табылады. Ауыл шаруашылығы дақылдарының фосформен қоректенуін жақсартудың перспективті бағыттарының бірі топырақ микроағзаларының көмегімен биологиялық фосфатты жұмылдыру болып табылады, бұл топырақтың және тыңайтқыштардың құрамындағы аз еритін фосфор қосылыстарын жоғары сатыдағы өсімдіктерге қолжетімді түрге көшіруге ықпал етеді. Қазақстан Республикасының солтүстік аймағының ризосфералық топырағынан аборигендік фосфатты жұмылдырғыш бактериялар бөлініп алынды. Бес фосфатты жұмылдыратын бактериялардан: *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 пр, *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 с, *Pseudomonas koreensis* 4/5 кр, *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 пр, *Pseudomonas koreensis* 3/4 пр, топырақ фосфатының жұмылдыру белсенділігі жоғары, үш белсенді штамм таңдалды: *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 пр, *Pseudomonas koreensis* 4/5 кр, *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 пр. Фосфатты мобилизациялаушы бактериялардың қасиеттері зерттелді, олардың өсімдіктердің өсуін ынталандыру және ерімейтін үшкальций фосфатын  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  өсімдіктерге қолжетімді түрге айналдыру қабілеті анықталды. Фосфатты мобилизациялау және өсімдіктердің өсуін ынталандыру қабілеті фосфатмобилизациялаушы бактерияларды енгізудің ауыл шаруашылығы дақылдарының өнімділігіне оң әсерін анықтайды.



Фосфатмобилизациялаушы бактериялардың таңдалған штамдары ауыл шаруашылығы дақылдарының кең ауқымдылығы үшін кешенді биологиялық тыңайтқыштарды құру үшін негіз ретінде перспективті болып табылады.

**Түйін сөздер:** фосфорды жұмылдыру, топырақ, бактерия, өсуді ынталандыру, бидай тұқымдары

Р. Аипова<sup>1\*</sup>, Е.Т. Тазабекова<sup>2</sup>, А.А. Курманбаев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Нур-Султан

<sup>2</sup>Казахстанско-Белорусский центр научного и технического сотрудничества

Евразийского университета имени Л.Н.Гумилева, Казахстан, г. Нур-Султан

\*e-mail: Rakhilya\_73@mail.ru

### Исследование свойств фосфатмобилизирующих бактерий, перспективных для повышения урожайности и сельскохозяйственных культур

Фосфор относится к основным питательным элементам, обеспечивающим формирование высоких и устойчивых урожаев сельскохозяйственных культур с благоприятным качеством товарной продукции. Одним из перспективных направлений улучшения фосфорного питания сельскохозяйственных культур является биологическая фосфатмобилизация с помощью почвенных микроорганизмов, способствующая переводу труднорастворимых соединений фосфора из почвы и удобрений в доступную для высших растений форму. Из ризосферной почвы северного региона Республики Казахстан выделены аборигенные почвенные фосфатмобилизирующие бактерии. Из пяти фосфатмобилизирующих бактерий: *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 пр, *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 с, *Pseudomonas koreensis* 4/5 кр, *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 пр, *Pseudomonas koreensis* 3/4 пр, отобраны три активных штамма: *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 пр, *Pseudomonas koreensis* 4/5 кр, *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 пр, с высокой активностью мобилизации фосфатов почвы. Изучены свойства фосфатмобилизирующих бактерий, установлена их способность стимулировать рост растений и переводить в доступную для растений форму нерастворимый трикальцийфосфат  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Способность к фосфатмобилизации и стимуляции роста растений определяет положительное влияние внесения фосфатмобилизирующих бактерий на урожайность сельскохозяйственных культур.

Отобранные штаммы фосфатмобилизирующих бактерий перспективны в качестве основы для создания комплексного биологического удобрения для широкого спектра сельскохозяйственных культур.

**Ключевые слова:** мобилизация фосфора, почва, бактерия, стимуляция роста, семена пшеницы.

#### Abbreviation

PMB – phosphate mobilizing bacteria;

PCR – polymerase chain reaction;

DNA – deoxyribonucleic acid;

rRNA – ribosomal ribonucleic acid.

#### 1. Introduction

Phosphorus is one of the most important mineral elements in plant life which can absorb it only in an inorganic form, mainly in the form of phosphate ions [1,2,3]. Despite the high content of total phosphorus in the soil, its bioavailability is a limiting factor in the growth, development and productivity of plants; this phenomenon is called by many authors as the “phosphorus paradox” [4, 5]. Between the phosphoric solution, there is a significant concentration gradient of neo-organic orthophosphate and the cytoplasm of plants. In the first concentrations of

the phosphate ions, it rarely exceeds 10  $\mu\text{M}$ , while in plants the cytoplasmic concentration is probably about 10 mM of phosphate ions [6,7].

In agriculture, the problem of a shortage of available phosphorus in the soil is solved by regular application of mineral fertilizers. However, only 10-15% of the applied phosphorus fertilizers are assimilated by plants and most of them pass into a form that is difficult for plants to access or are washed out with groundwater [8]. An alternative to the non-ecological use of mineral phosphorus fertilizers to increase the yield of agricultural crops is the biological mobilization of phosphates from insoluble compounds through the use of phosphate-mobilizing microorganisms capable of converting insoluble phosphates from fertilizers and soil into a soluble form [9-17].

Grain farming is the main branch of agriculture in Kazakhstan. In recent years, the total sowing of grain crops has occupied over 80% of the sown area

of agricultural crops. The average seed yield is on average 10-13 c/ha. The country produces about 13.5 – 20.1 million tons of seed, which is a low figure in comparison with other countries. One of the reasons for this is the lack of phosphorus nutrition in plants. To solve this problem, we tried to isolate effective phosphate-mobilizing bacteria for creating a biological product.

The purpose of the study is the isolation of phosphate-mobilizing bacteria from the rhizosphere of plants, the selection and production of active strains that have a positive effect on the development of agricultural plants.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Isolation of phosphate-mobilizing bacteria.

The object of the study was microorganisms isolated from the rhizosphere soil of agricultural plants in the Akmola region Republic of Kazakhstan. Soil samples for microbiological analyzes were taken from the root and root zones of plants in compliance with the rules of asepsis and placed in sterile parchment bags. The average soil sample was obtained by mixing three soil samples taken according to the “envelope principle”. Isolation of microorganisms from soil was carried out by sowing on elective nutrient media, that dissolve calcium orthophosphates were detected on solid nutrient media of Pikovskaya – M1 [18], Muromtsev – M2 [19], and NBRIP (National Botanic Research Institutes phosphate growth medium) with tricalcium phosphate – M3 [21].

Active strains were selected from colonies forming zones of phosphate dissolution. The culture medium prepared in this way was poured 25 ml into Petri dishes and, after the agar had solidified, 0.1 ml of soil suspension from dilutions  $10^{-4}$  –  $10^{-7}$  was inoculated superficially. The dishes were incubated at 28°C for 3 – 10 days. Colonies were taken into account, around which large zones of calcium phosphate dissolution were formed.

### 2.2 Identification of phosphate mobilizing bacteria

The identification of PMB strains was carried out by determining the direct nucleotide sequence of the 16S rRNA gene fragment, followed by determining the nucleotide identity with the sequences deposited in the international database GeneBank. Extraction of DNA followed by PCR and sequencing. Genomic DNA of strains was isolated using the Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Germany) according to the manufacturer’s instructions. The statistical significance of phylogenetic

reconstructions was assessed by the “jackknife” method (“Bootstrap”) by constructing alternative trees [22,23].

The identification of microorganisms was also carried out on the basis of comparing data on the composition and ratio of peptides. The peptides were obtained by hydrolysis of proteins in the colonies of the studied microorganism, with similar data of typical strains from the Maldi Biotyper database (Bruker Daltonic Germany) by mass spectrometry on MALDI-TOF, Microflex LT. The instrument was calibrated using a commercial protein mixture (Bruker Daltonics). On the basis of these data, the similarity (belonging to the same species and genus) of the studied organism with the organisms presented in the database was estimated [24,25].

### 2.3 Activity estimation of phosphate-mobilizing strains.

The evaluation of phosphorus mobilization of motile forms in a liquid medium under the action of the studied bacteria was carried out according to the method [19]. Sterile medium was poured into 100 ml flasks and inoculated with bacterial cultures. A non-inoculated medium served as a control. Then the flasks were incubated on a shaker for 15 days at a speed of 180 revolutions per minute at 28°C. The mobilization activity of mobile phosphorus was determined on the 3, 5, 7, 10 and 15 days after the start of the experiment. The concentration of phosphates in the solution was determined by the colorimetric method using the yellow phosphomolybdenum complex [26].

### 2.4 Biological activity of phosphate-mobilizing microorganisms.

For inoculation of seeds, 3-day-old cultures grown on a nutrient medium SPB were used [21]. The study of the effect of seed inoculation was carried out with phosphate-mobilizing microorganisms: (*Acinetobacter calcoaceicus* 2/5 pr (option 2 in the 5<sup>th</sup> sample of wheat rhizosphere soil), *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c (option 1 in the 7<sup>th</sup> sample of beet rhizosphere soil), *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr (option 4 in the 5<sup>th</sup> sample of maize rhizosphere soil), *Acinetobacter calcoaceicus* 1/5 pr (option 1 in the 5<sup>th</sup> sample of wheat rhizosphere soil), *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr (option 3 in the 4<sup>th</sup> sample of wheat rhizosphere soil). The density of the bacterial suspension is  $10^9$  cells / ml. To assess the effect of phosphate-mobilizing microorganisms on seed germination, the objects of study were the seeds of the “Rubin” radish variety (*Raphanus sativus* var. *Radicula*), the “Turkestan” cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.) and the “Astana 2” wheat

varieties (*Triticum aestivum* L.). The seed surface was sterilized with a 10% sodium hypochlorite solution for 20 min, after which the seeds were washed with 70% ethanol and three times with sterile distilled water.

Observing the rules of asepsis, the inoculated seeds were placed on a moistened filter paper in Petri dishes. As a control seeds soaked in sterile water and sterile medium were used for the cultivation of bacteria. Incubation was performed at 28°C. The experiment was repeated three times. All parameters were measured at least three times.

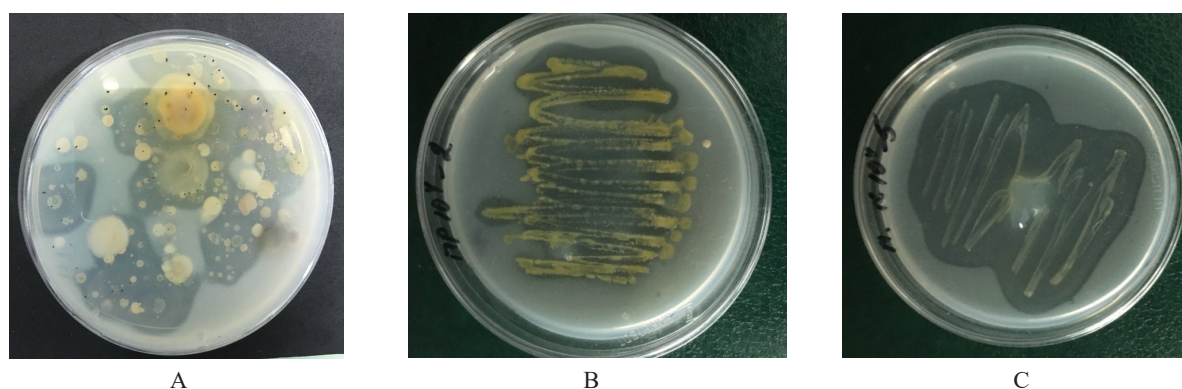
Static data processing was performed using Microsoft Office Excel 2007 spreadsheets. The signifi-

cance of differences was assessed by the Student's criterion for  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Isolation of active phosphate-mobilizing bacteria

During the study, 130 bacterial strains were isolated, of which 28 were pure cultures of phosphate-mobilizing bacteria. It was noted, that when isolating phosphate-mobilizing bacteria from soil samples on M1 and M3 media, clearly visible zones of phosphate dissolution were observed (Figure 1).



Zones of dissolution around bacterial colonies A – M1 (Pikovskaya medium); B – M2 (Muromtsev medium); C – M3 (NBRIP medium), on the 5th day of cultivation

**Figure 1** – Zones of phosphate dissolution

At the next stage, the ability of bacteria to mobilize phosphate from various insoluble compounds was assessed. The highest phosphate-dissolving activity have bacterial isolates *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr, *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7c, *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, and *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr and *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr with the diameter of the dissolution zones

ranged from 15 mm to 30 mm. On M2 medium, the appearance of clearing zones was not observed even when the most active microorganisms were cultivated for more than 7 days (Table 1).

Thus, the glucose-ammonium medium M1 and M3 medium can be used as alternatives to M2 medium, when isolating soil phosphate-mobilizing microorganisms.

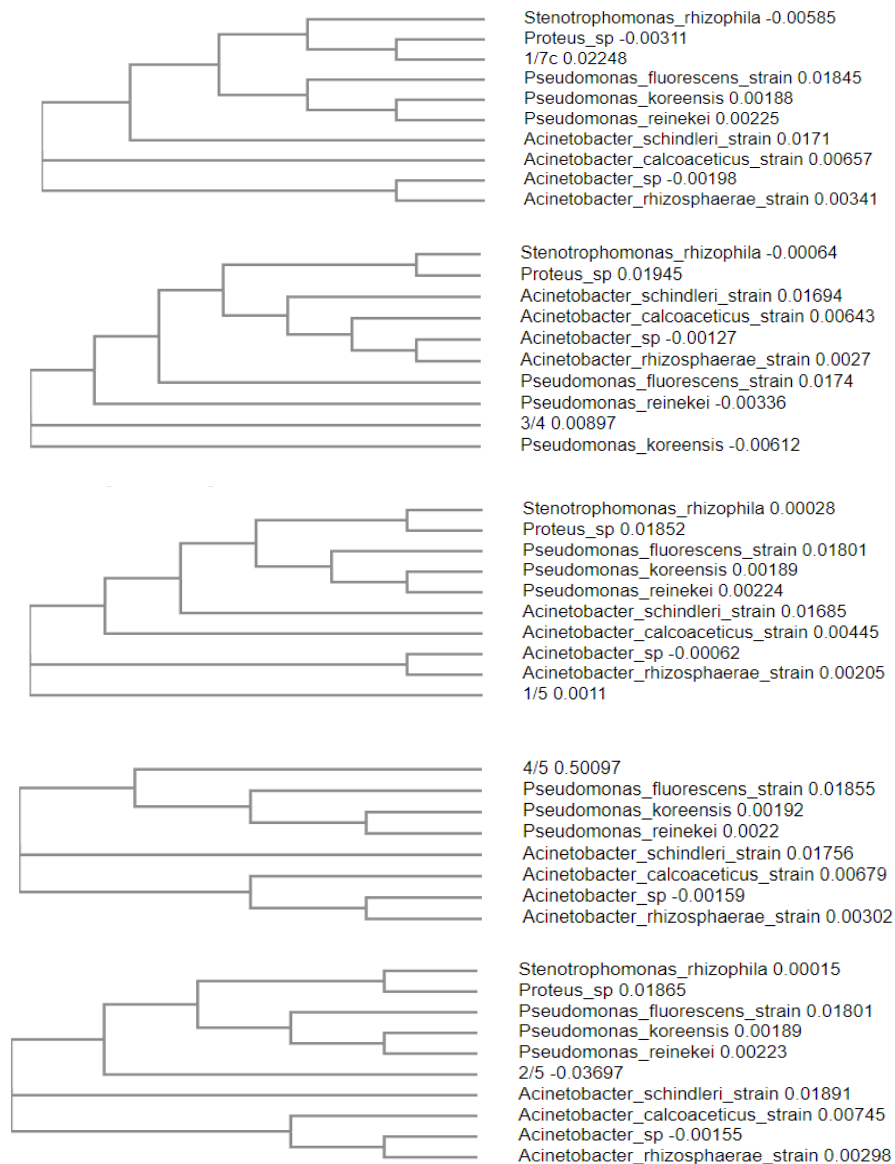
**Table 1** – Phosphate-mobilizing activity of bacteria on various media according to the diameter of the phosphate dissolution zones

Strain name of bacterial culture	Diameter of $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ dissolution zones in different media, d _mm		
	M1	M2	M3
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2/5 pr	15	00	25
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> 1/7c	17	00	19
<i>Pseudomonas koreensis</i> 4/5 kr	30	00	30
<i>Pseudomonas koreensis</i> 3/4 pr	25	02	30
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 1/5 pr	23	01	28

*Identification of phosphate-mobilizing bacteria.*

When carrying out the genetic identification of strains 1/5 pr, 2/5 pr 3/4 pr, 4/5 kr and 1/7 c, a nucleotide sequence of 660 bp was obtained based on the analysis of the 16S rRNA gene nucleotide sequence after the removal of terminal fragments, which was identified in Gene Bank using the BLAST algorithm. When identified using the international database NCBI, the strains identified had the maximum iden-

tity (97.66 – 99.86%). However, taking into account the literature data indicating the presence of nucleotide sequence errors in such international banks as the Gene Bank and the Ribosomal Database Project (RDP-II), a phylogenetic tree was additionally built with the 16S rRNA nucleotide sequences of the gene for reference strains of this species (NCBI National Center for Biotechnology Information, USA) (Figure 2).



Phylogenetic tree showing phylogenetic relationships between strains 1/7 c, 3/4 pr, 1/5 pr, 4/5 kr and 2/5 pr and typical strains of related species.

**Figure 2** – Phylogenetic tree based on the analysis of the 16S rRNA

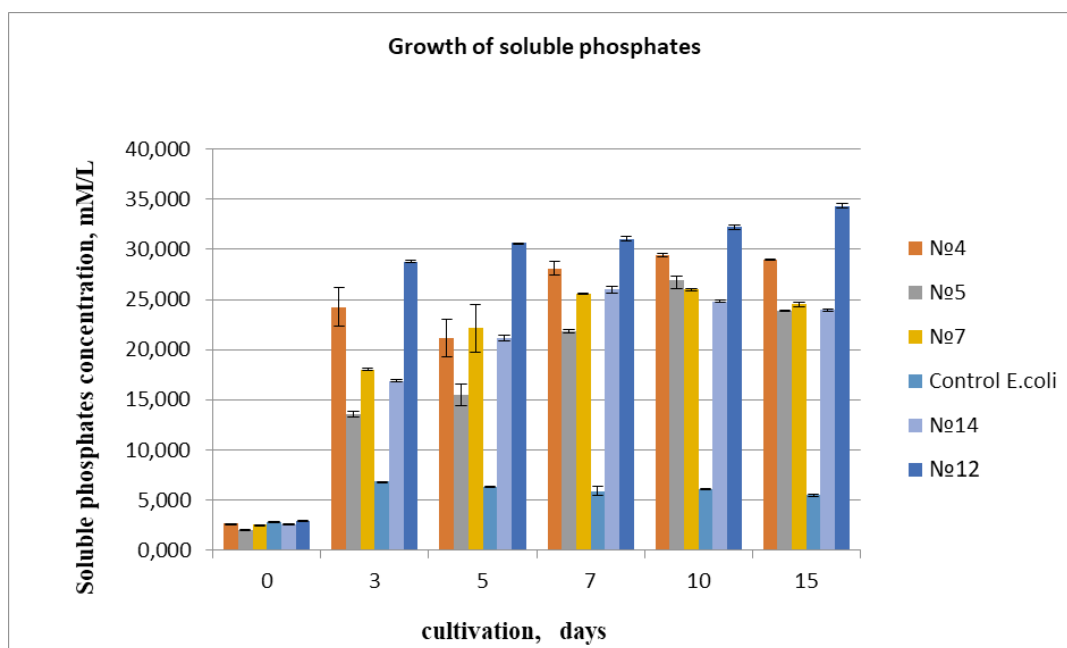


Analysis of the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene made it possible to assign strains 1/5 pr and 2/5 pr to the genus *Acinetobacter*, strains 3/4 pr and 4/5 kr to the genus *Pseudomonas*, and strain 1/7 c to the genus *Stenotrophomonas*. Strain 1/7 c had 99.58% identity with the *Stenotrophomonas rhizophila* strain. Strains 3/4 pr and 4/5 kr had 99.81% and 100% identity with the *Pseudomonas koreensis* strain, and strains 1/5 pr and 2/5 pr had 99.81% and 99.50% identity with the strain *Actnetobacter calcoaceticus*.

In order to assess the ability of PMB strains to mobilize phosphorus from insoluble soil phosphates, an experiment was performed with strains of *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr, *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c, *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr bacteria within 15 days on NBRIP medium. The content of soluble phosphates was determined in the culture liquid.

As a result of the studies, the phosphate-mobilizing ability of the strains was determined. With a constant level of soluble phosphate fraction in sterile control (3.1 mM/l), the increase in soluble phosphates by the biomass of the strain №14 – *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr and №7 – *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr was – 25.5 mM/l, biomass of strain №5 – *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c – 27.0 mM/l, biomass of strain №12 – *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr – 34.3 mM/l, biomass of strain №4 – *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr – 30.0 mM /l (Figure 3).

Of the five PMB strains, the most active were strains №14 – *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr – 30.0 mM/l, №12 – *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr – 34.3 mM/l, №5 – *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c – 27.0 mM/l of soluble phosphates, respectively. Strains №14 – *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr – 25.0 mM/L and №7 – *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr – 25.5 mM/l had a slightly lower activity.

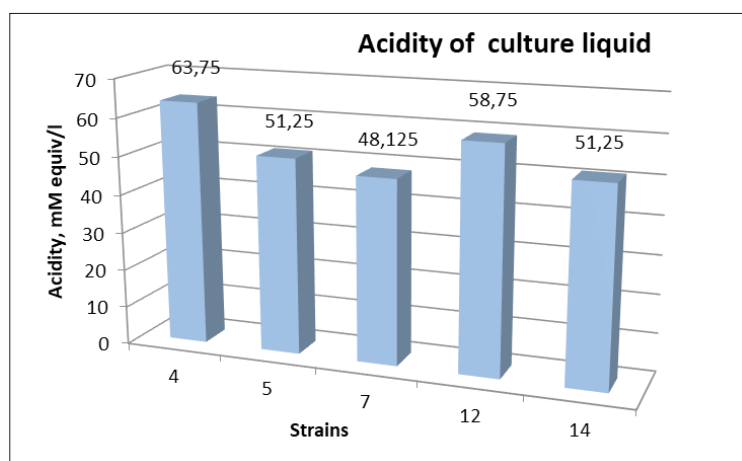


**Figure 3** – Dynamics of the formation of phosphorus mobile forms by phosphate-mobilizing bacteria. №4 – *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr; №5 – *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c; №7 – *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr; №12 – *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr; №14 – *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr.

To explain the mechanisms of the phosphate-mobilizing ability, it was suggested that bacteria acidify the medium with organic acid.

Therefore, an experiment was carried out to determine the total acidity of the medium. The titrated solution of sodium hydroxide 0.025 M was prepared and determined the acidity of the envi-

ronment of these strains by acid-base titration of the indicator phenolphthaleine. The amount of total acidity directly correlates with an increase in the concentration of soluble phosphates and, in fact, with the effectiveness of the strain. The results were expressed in mMol equivalent of hydrogen ions (Figure 4).



**Figure 4** – Influence of the total acidity of the environment on the phosphate-mobilizing activity of phosphate mobilizing strains

It was found that five promising phosphate-mobilizing strains also produced more organic acids. Strains №4 – *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr, №5 – *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c, №7 – *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, №12 – *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr and №14 – *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr, which acidity approached 50 mMeq/L, which directly correlates with their phosphate-mobilizing ability. From five PMB strains, the most active were strains №4 – *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr – 63.75 mMequiv/L, №5 – *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c – 51.25 mMequiv/L, №14 – *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr – 51.25 mMeq/L and №12 – *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr – 58.75 mM eq/L, strain №7 – *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr – 48.125 mMeq/L had a slightly lower activity. Selected phosphate-mobilizing bacterial strains are a potential basis for creating bacterial fertilizers to improve phosphorus nutrition of agricultural plants.

*Testing the effect of phosphate-mobilizing bacteria on agricultural crops in laboratory conditions.*

Active strains of PMB were selected to study the growth-stimulating effect on seed germination, growth and development of agricultural crops seedling in laboratory experiments. The selected isolates stimulate the germination of the most studied crops. A higher germination rate compared to the control was revealed in variants of the experiment with seed treatment with strains of *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr, *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c, *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, *Pseudomonas kore-*

*ensis* 3/4 pr and *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr -80%), while in the control the germination rate was only 20-30% (Figure 5).

Based on the data obtained, it can be seen that under the influence of pre-sowing treatment of cotton seeds with strains of phosphate-mobilizing rhizobacteria, a stimulating effect on the growth and development of cotton plants was observed. In all variants of the experiment, the green and dry weight of cotton plants was greater than in the control. At the same time, the wet weight of one plant increased 4.0 – 4.5 times in comparison with the control variant. It was shown that the maximum accumulation of green mass of plants was observed when cotton seeds were treated with *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr and *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr strains, which have the highest positive effect on plant development (Figure 6).

Thus, bacterization of cotton seeds by phosphate-mobilizing rhizosphere bacteria has a complex effect on plants. At the stage of manifestation of the first roots, the mineral nutrition of the seedling improves due to a more developed root system, and on the other, due to an increase in the concentration of phosphorus compounds available for plants in the rhizosphere and rhizoplane (phosphate-mobilizing activity of rhizosphere bacteria). This promotes the development of stronger seedlings and gives a start for further growth and development of plants. After germination, inoculated cotton seedlings accumulate biomass faster due to a well-developed root system and photosynthetic apparatus.

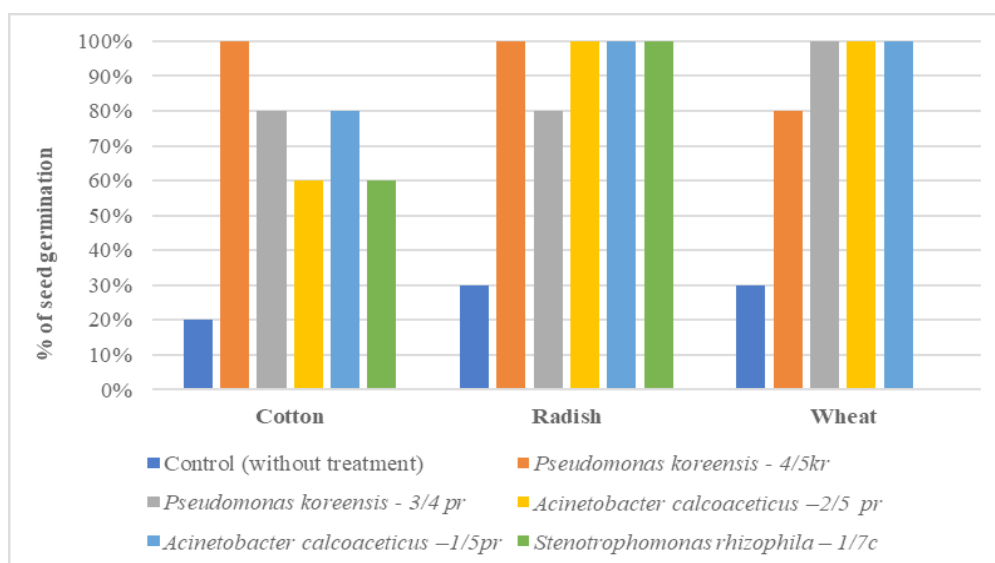


Figure 5 – Growth-stimulating effect of crops on the germination of cotton, radish and wheat seeds.

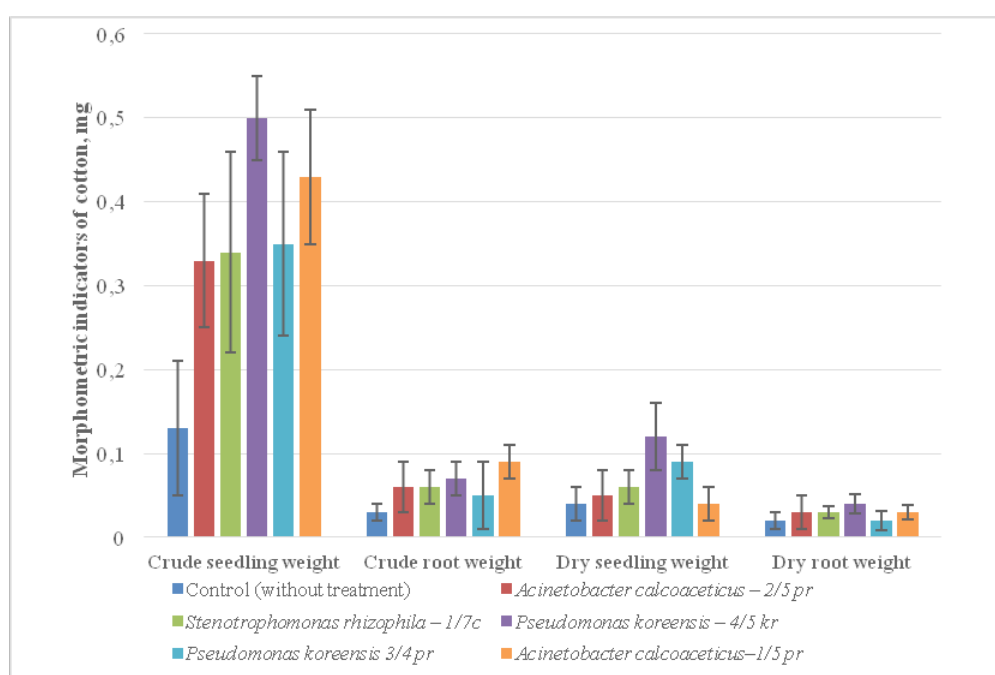


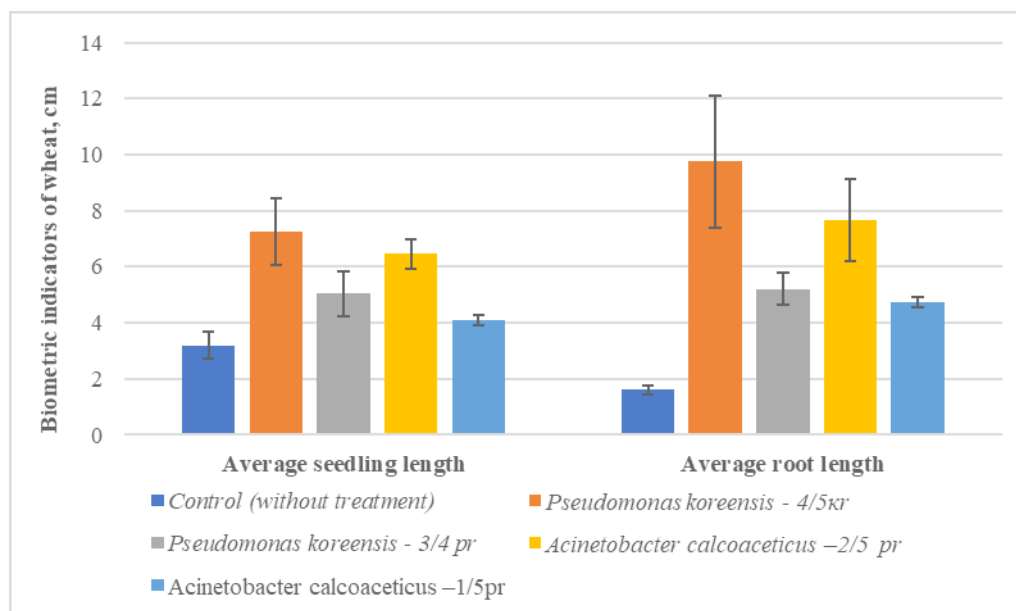
Figure 6 – Influence of strains of phosphate-mobilizing bacteria on the biomass of a cotton plant variety “Turkestan”

In laboratory studies with wheat seedlings, it was shown that the strains of *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr, *Stenotrophomonas rhizophila* 1/7 c, *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, *Pseudomonas koreensis* 3/4 pr and *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr exhibit growth promoting activity, in addition to phosphate stimulating. Bacterization of wheat seeds with the strains *Acinetobacter calcoaceticus* – 2/5 pr and *Pseudomonas koreensis* – 4/5 kr accelerated

seed germination. At the stage of the first roots appearance, the mineral nutrition of the seedling improves, on the one hand, due to a more developed root system. On the other hand, due to an increase in the concentration of phosphorus compounds in the rhizosphere and rhizoplane for plants. This promotes the development of stronger seedlings and gives a start for further plant growth and development (Figure 7).

The effect of the selected strains of phosphate-mobilizing bacteria on wheat seedlings was expressed in a change in root morphology: an increase in the number and length of roots by 2.5-3.0 times. The most active stimulants were isolates of *Acin-*

*netobacter calcoaceticus* 2/5 pr and *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr, a statistically significant increase in root length was obtained on average by 74.5% – 100% and wheat seedlings on average 88.4% – 100%, respectively.



Data on the effect of PMB on the biometric parameters of wheat seedlings of the "Astana-2" variety (after 21 days of laboratory microvegetation experiment)

**Figure 7** – The influence of phosphate-mobilizing bacteria strains on the growth of seedlings and root formation of spring wheat variety "Astana – 2"

Thus, the data obtained made it possible to establish that the strains of rhizosphere bacteria are able not only to dissolve trisubstituted calcium orthophosphate, but also to actively stimulate the growth of wheat plants.

Evaluation of the biological activity of phosphate-mobilizing strains showed that they have growth-stimulating properties.

As a result of the data obtained, it was found that all the studied crops had the ability to increase the germination of radish plant seeds by 80 – 100% compared to the control. It was also noted that as a result of seed treatment with phosphate-mobilizing rhizobacteria, there is a significant stimulation of the embryonic roots and shoots (Figure 8).

The research results show that under the action of biologically active substances of bacteria, the growth force of seeds increases, which is manifested in the length increase of the embryonic roots and shoots. The greatest length of seedlings and roots was established when seeds were treated with phos-

phate-mobilizing microorganisms *Acinetobacter calcoaceticus* 2/5 pr, *Pseudomonas koreensis* 4/5 kr and *Acinetobacter calcoaceticus* 1/5 pr etc. The length of seedlings increased by 5.6 cm, germ roots by 5.2 cm, compared with control. The studied agronomically valuable microorganisms based on phosphate-mobilizing rhizobacteria had a positive effect on the growth of radish plants from the earliest stages of seed inoculation.

Based on the results of the data obtained, the most promising phosphate-mobilizing strains of soil microorganisms were selected for further research.

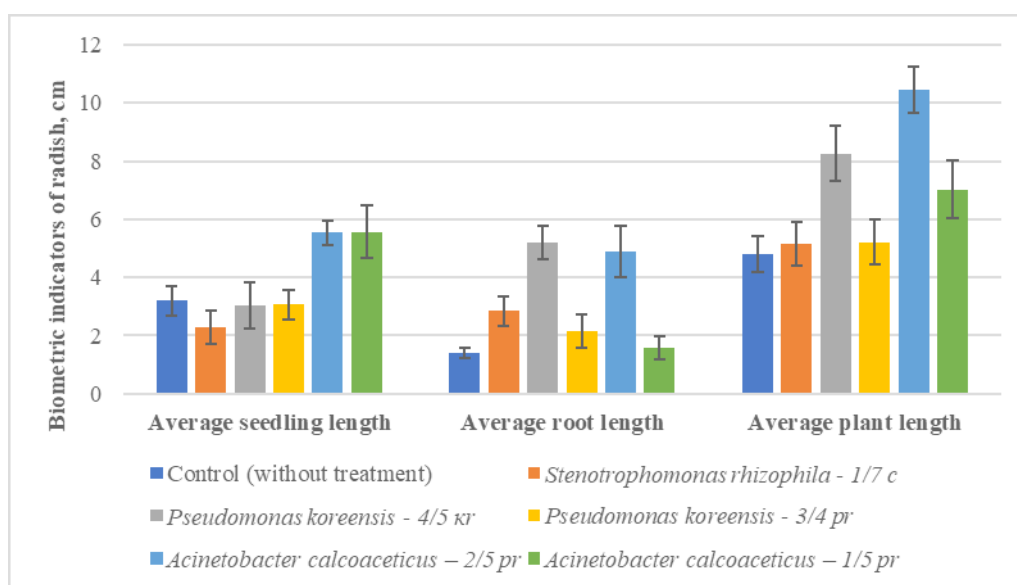
Thus, the experiment made it possible to determine the strains of rhizosphere bacteria most active in terms of their ability to phosphate mobilization, which was expediently tested in field experiments as a basis for bacterial fertilizers.

To assess the effect of phosphate-mobilizing bacteria on the yield of spring wheat, field experiments were carried out on southern carbonate chernozem soil.



On the crops of spring wheat variety “Shortandinskaya 2012”, the effectiveness of phosphate-mobilizing bacteria on the provision of southern carbonate chernozem soil with phosphorus and the dose of phosphorus fertilizers was studied. The dependence of the yield of spring wheat on the content of mobile phosphorus in the southern calcareous chernozem soil has been established. The introduction of drug 1 (based on phosphate-mobilizing rhizobacteria) against the background

without the introduction of  $P_2O_5$  made it possible to obtain reliable increases in yield – 2.26 t/ha of grain, respectively. When the soil was saturated with mobile phosphorus on average up to 123.5 kg/ha, the effect of bacterization of spring wheat decreased, the increase in grain was 2.18 t/ha. The use of preparation 1 (based on phosphate-mobilizing rhizobacteria) was effective only without the addition of  $P_2O_5$ , the increase from seed bacterization averaged 2.28 t/ha of grain.



**Figure 8** – The influence of strains of phosphate-mobilizing bacteria on the seedlings growth and root formation of the “Rubin” radish variety

Accordingly, the effectiveness of the use of phosphate-mobilizing rhizobacteria on spring wheat was established, depending on the application of  $P_2O_5$  in the southern-calcareous chernozem soil. The introduction of  $P_2O_5$  with Preparation 1 (phosphate-mobilizing bacteria) when the soil is supplied with mobile phosphates is impractical.

## Conclusion

Modern trends in the creation, development and promotion of “organic” farming technologies imply the replacement of chemicals used in intensive agricultural production with biological ones. In this regard, the creation of biological products based on effective native phosphate-mobilizing microorganisms is an actual task of modern agriculture.

Thus, based on the data obtained on the properties of new strains of phosphate-mobilizing bac-

teria, the degree of phosphate mobilization and the ability to stimulate plant growth and development, the selected phosphate-mobilizing bacterial strains is a potential basis for a new bacterial fertilization to improve the phosphorus nutrition of agricultural crops. Improving the mineral nutrition of plants contributes to an increase in yields and an improvement in the quality of agricultural products.

## Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

## Financing

The work was carried out within the framework of the state program “BR06349586” of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan.

## References

- 1 Lambers H., Grammer M.D., Pearse S.J., Veneklaas E.J. (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann. Bot.*, vol. 98, pp. 693-713.
- 2 Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol.*, vol.34, pp.33-41
- 3 Yasmin H., Bano A. (2011) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khexra salt range and attock. *Pakistan Journal of Botany.*, vol.3, pp. 1663-1668.
- 4 Marschner H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press, p.889.
- 5 Lambers H., Chapin P.S., Pons T. L. (2008) *Plant Physiological Ecology*. Second Edition. Springer, p. 604.
- 6 Ezawa T., Smith S.E., Smith F.A. (2002) P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*, vol. 244, pp. 22-230.
- 7 Menezes-Blackburn D., Giles C., Darch T., George TS, Blackwell M., Stutter M., Shand Ch, Lumsdon D, Cooper P., Wendler R., Brown L., Almeida DS, Wearing C., Zhang H., Haygarth PM (2018) Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. *Plant Soil* 427:5–16. DOI 10.1007/s11104-017-3362-2
- 8 Dunaitsev A. (2010) Isolation of phosphate-mobilizing microorganisms and the study of the possibility of their use in industry and agriculture. Author. diss. Cand. Biol. Sciences: 03.02. 03.01.06, Obolensk: Science, p 29.
- 9 Thakaria D., Talukdar N.C., Goswami C., Hazarical S., Boro R.C., Khan M.R. (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr. Sci.*, vol. 86, pp.978-985.
- 10 Mehrvarz S., Chaichi M.R., Alikhani H. A. (2008) Effects of Phosphate Solubilizing Microorganisms and Phosphorus Chemical Fertilizer on Yield Components of Barely (*Hordeum vulgare* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ.Sci.*, vol. 3(6), pp. 823-828.
- 11 H.J.Son (2006) Solubilization of inorganic phosphates by a novel salt- and pH- tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology.*, vol. 97, pp.204-210.
- 12 Bais H.P., Perry L.G. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, vol.57, pp. 233-266.
- 13 Fankem Henri., Duble A., John K. (2008) Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promoting by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. *African Journal of Microbiology Research*, vol. 2, pp. 171-178.
- 14 Sharifi R.S, Khavazi K. (2011) Effects of seed priming with Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attribute of maize (*Zea mays* L.) hybrids. *J Food Agric. Environ.*, vol. 9, pp. 496-500.
- 15 Cruz-González X, Laza-Pérez N, Mateos PF, Rivas R. (2017) Analysis and effect of the use of biofertilizers on *Trifolium rubens* L., a preferential attention species in Castile and Leon, Spain, with the aim of increasing the plant conservation status. *AIMS Microbiol.*, vol. 3 (4), pp. 733- 746.
- 16 Aeron A., Khare E., Kumar C., Vijay J., Meena S., Mohammed S., Aziz A. (2019) Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: Lessons from the past and objectives for the future. *Arch. Microbiol.* vol. 202, pp. 665–676
- 17 Sattari S., Bouwman A., Giller K., van Ittersum M. (2012) Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. *Proc Natl Acad Sci*, vol. 109, pp. 6348–6353
- 18 Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, vol. 17, pp. 362 – 370.
- 19 Zviagintsev D.G. (1991) *Metody pochvennoi mikrobiologii i biohimii* [methods of soil microbiology and biochemistry]. M, Izdatelstvo MGU, pp. 59 – 75.
- 20 Nautiyal C.S (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, vol.170, pp. 265–270.
- 21 Clarridge III J. E. (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, vol.17, pp. 840–862.
- 22 Janda J., Abbott S. (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 45, pp.2761–2764.
- 23 Koubek J. (2012) Whole – cell MALDI – TOF: Rapid screening method in environmental microbiology. *International biodeterioration biodegradation. Journal of Environmental Microbiology*, vol.69, pp. 82-86.
- 24 Magallon-Servín P., Antoun H., Taktek S., Bashan Y., De-Bashan L. (2020) The maize mycorrhizosphere as a source for isolation of arbuscular mycorrhizae-compatible phosphate rock-solubilizing bacteria. *Plant Soil*. Vol. 451, pp.169–186
- 25 Adelowo E.F., Agele S. (2016) Spectrophotometric analysis of phosphate concentration in agricultural soil samples and water samples using molybdenum blue method. *Brasian Journal of Biological Science*, vol. 12, pp234-239.
- 26 Mehta, S., Nautiyal, C.S., (2001) An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* Vol.43 (1), pp.51-56.

MPNТИ 34.15.25;62.39.51;65.63.39 <https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.04>**Ж.Д. Акишев<sup>1,2</sup>** , **А.Е. Турсунбекова<sup>3</sup>** , **Б.Б. Хасенов<sup>1\*</sup>** <sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Нур-Султан<sup>2</sup>Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Нур-Султан<sup>3</sup>Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Казахстан, г. Нур-Султан\*e-mail: [khasenov@biocenter.kz](mailto:khasenov@biocenter.kz)

## МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ВЕРБЛЮЖЬЕГО ХИМОЗИНА

Одним из самых ранних биотехнологических применений ферментов является производство сыра. Высокая специфическая молокосвертывающая активность химозина обеспечивает его преимущество перед другими протеазами в сыроделии. Действие химозина основано на гидролизе связи между аминокислотными остатками Phe<sup>105</sup> и Met<sup>106</sup> в молекуле κ-казеина, что вызывает дестабилизацию казеиновых мицелл, свертывание молока и разделение его на сгусток и сыворотку. С помощью дрожжевого штамма-продуцента *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB получен рекомбинантный химозин двугорбого верблюда *Camelus bactrianus*. Рекомбинантный химозин был очищен с помощью ионообменной хроматографии. Изучена молокосвертывающая активность рекомбинантного верблюжьего химозина в отношении кобыльего молока в зависимости от pH и температуры. Установлено, что оптимальным значением, при котором наблюдается максимальная активность рекомбинантного верблюжьего химозина в отношении кобыльего молока pH составляет 4.0, а оптимальной температурой 70°C. Активность рекомбинантного верблюжьего химозина на кобыльем, коровьем и козьем молоке составила 123, 9605 и 4650 ед/мг, соответственно. Показано, что рекомбинантный верблюжий химозин обладает высокой коагуляционной активностью, достаточной для получения творога и сыра. Выход сырного сгустка с 6 л козьего молока составил 936 грамм. Рекомбинантный верблюжий химозин имеет перспективу применения в технологиях переработки коровьего и козьего молока и получения сыра.

**Ключевые слова:** химозин, молоко, рекомбинантный фермент, молокосвертывающая активность, коагуляция.

Z. Akishev<sup>1,2</sup>, A.E. Tursunbekova<sup>3</sup>, B. Khasenov<sup>1\*</sup><sup>1</sup>National center for biotechnology, Kazakhstan, Nur-Sultan<sup>2</sup>L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Nur-Sultan<sup>3</sup>S.Seifullin Kazakh Agro Technical University, Kazakhstan, Nur-Sultan\*e-mail: [khasenov@biocenter.kz](mailto:khasenov@biocenter.kz)

### Milk clotting activity of recombinant camel chymosin

One of the earliest biotechnological applications of enzymes is cheese production. The high specific milk-clotting activity of chymosin gives it an advantage over other proteases in the cheese industry. The action of chymosin is based on hydrolysis of the bond between the amino acid residues Phe<sup>105</sup> and Met<sup>106</sup> in the κ-casein molecule, which causes destabilisation of casein micelles, coagulation of milk and its separation into a clot and a whey. A recombinant chymosin of the camel *Camelus Bactrianus* was obtained using the yeast producer strain *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB. The recombinant chymosin was purified by ion exchange chromatography. The milk-clotting activity of recombinant camelian chymosin against mare's milk was studied as a function of pH and temperature. It was found that the optimum value at which the maximum activity of recombinant camel's chymosin with respect to mare's milk is observed is pH 4.0 and the optimum temperature is 70°C. The activity of recombinant camel chymosin on mare, cow and goat milk was 123, 9605 and 4650 units/mg, respectively. Recombinant camel chymosin was shown to have high coagulation activity, sufficient to produce curd and cheese. The yield of cheese clot from 6 l of goat milk was 936 grams. Recombinant camel chymosin has prospects for use in cow's and goat's milk processing and cheese production technologies.

**Key words:** chymosin, milk, recombinant enzyme, milk-clotting activity, coagulation.

Ж.Д. Акишев<sup>1,2</sup>, А.Е. Турсунбекова<sup>3</sup>, Б.Б. Хасенов<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.<sup>2</sup>Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.<sup>3</sup>С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

\*e-mail: khasenov@biocenter.kz

**Рекомбинантты түйе химозинінің сүт үю белсенділігі**

Ферменттерді биотехнологиялық қолданудың ең алғашқы түрлерінің бірі ірімшік өндіру болып табылады. Химозиннің жоғары спецификалық сүт үю белсенділігі оның ірімшік жасаудағы басқа протеазалардан артықшылығын қамтамасыз етеді. Химозиннің әрекеті к-казеин молекуласындағы Phe<sup>105</sup> және Met<sup>106</sup> аминқышқылдарының қалдықтары арасындағы байланыстың гидролизіне негізделген, бұл казеин мицеллаларының тұрақсыздануын, сүттің коагуляциясын және оның ұйығыш пен сарысуға бөлінуін тудырады. Рекомбинантты бактриан түйе химозині *Camelus bactrianus* ашытқы штаммының *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB көмегімен алынды. Рекомбинантты химозин ион алмасу хроматографиясы арқылы тазартылды. Бие сүтіне қатысты рекомбинантты түйе химозинінің сүт үю белсенділігі рН және температураға байланысты зерттелді. Бие сүтіне қатысты рекомбинантты түйе химозинінің максималды белсенділігінің оңтайлы мәні рН 4,0, ал оңтайлы температура 70°C болатыны анықталды. Бие, сиыр және ешкі сүтіндегі рекомбинантты түйе химозинінің белсенділігі сәйкесінше 123, 9605 және 4650 бірлік/мг құрады. Рекомбинантты түйе химозинінің сүзбе мен ірімшік өндіруге жеткілікті жоғары коагуляциялық белсенділігі бар екені дәлелденді. 6 литр ешкі сүті қосылған ірімшік ұйығышының шығымы 936 грамм болды. Рекомбинантты түйе химозинін сиыр мен ешкі сүтін өңдеу және ірімшік өндіру технологияларында қолдану мүмкіндігі бар.

**Түйін сөздер:** химозин, сүт, рекомбинантты фермент, сүт үю белсенділігі, коагуляция.

**Введение**

Одним из самых ранних биотехнологических применений ферментов является производство сыра [1]. Активные ингредиенты этого процесса были идентифицированы как протеолитические ферменты пепсин и химозин, известные как «сычужный фермент» [2]. Химозин (ЕС 3.4.23.4) – аспаргиновая пептидаза, принадлежащая к семейству пепсиноподобных ферментов [3]. Действие химозина основано на гидролизе связи между аминокислотными остатками Phe<sup>105</sup> и Met<sup>106</sup> в молекуле капа-казеина, что вызывает дестабилизацию казеиновых мицелл, свертывание молока и разделение его на сгусток и сыворотку [4]. Высокая специфическая молокосвертывающая активность химозина обеспечивает его преимущество над другими протеазами в сыроделии.

До недавнего времени технология получения химозина была основана на выделении фермента из желудка новорожденных телят, ягнят и козлят, но в настоящее время химозин, можно получать с использованием рекомбинантной технологии. Следует отметить, что рекомбинантный телячий химозин является первым ферментом, одобренным FDA к использованию в пищевой промышленности [5]. К сегодняшнему дню более 90% используемого сычужного фермента в мире является химозином, полученном путем

ферментации [6]. На рынке коммерческих ферментов для сыроварения доминирует телячий химозин, но исследования по практическому использованию проводятся и в отношении химозинов, полученных от других животных, например, яка (*Bos grunniens*) [7] и алтайского марала (*Cervus elaphus*) [8].

Перспективным сычужным ферментом выступает верблюжий химозин, который может быть использован для производства сыра из коровьего [9-12] и верблюжьего молока [13, 14]. Известно, что верблюжий химозин обладает на 70 % большей молокосвертывающей активностью и является более термостабильным, чем телячий химозин [15, 11], что делает его привлекательным для коммерческого производства сыра. В частности, изучение химозина из одногорбого верблюда *Camelus dromedarius* позволило его рекомендовать в качестве молокосвертывающего фермента [15, 11, 16]. Рекомбинантный химозин *Camelus dromedarius* был успешно экспрессирован в мицелиальных грибах *Aspergillus niger* [15] и в дрожжах *Pichia pastoris* [17]. Уже доступна его рекомбинантная версия в виде коммерческого продукта под названием Chy-MAX M (Ch. Hansen). Изучены биохимические свойства химозина среднеазиатского двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* [18], которые по ряду параметров оказались близки химозину из *Camelus dromedarius* несмотря на то, что имеют



ся различия в двух аминокислотных заменах в положениях Val229Leu и Ser294Asn.

Наиболее известным и практически единственным молочным продуктом из кобыльего молока является кумыс. Это кисломолочный алкогольный напиток, который создается примерно с 2000 года до нашей эры. Он наиболее известен и широко потребляется в регионах Центральной Азии. Его получают из свежего сырого молока, заквашенного заквасками (в основном молочнокислыми бактериями и дрожжами) в дозе 20-30% и хранящегося в подходящей емкости или в ферментационном мешке, обычно при температуре 20-30°C [19]. Производство сыра из кобыльего молока считается нецелесообразным из-за проблем со свертываемостью [20]. Однако, сравнительно недавно было показано, что сыр может быть изготовлен из молока ослиц (относящихся как и кобылицы к роду *Equus*) при соблюдении специальных технологических подходов, таких как использование определенных видов сычужного фермента, особые условия коагуляции, обогащение другими видами молока и добавление трансглутаминазы для лучшего сшивания молочных белков [21].

Представляется интересным апробировать молокосвертывающую активность рекомбинантного верблюжьего химозина *Camelus bactrianus* в отношении коровьего, козьего и кобыльего молока, что и определило цель настоящей работы.

## Материалы и методы

*Векторы, штаммы, клонирующие ферменты и химикаты*

Химические реактивы, использованные в данном исследовании, были молекулярно-биологического или чистого аналитического класса и приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США) и AppliChem (Дармштадт, Германия). Ферменты хранили при -20°C, а химические реактивы – в соответствии с рекомендациями производителя.

*Определение концентрации белка*

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [22] с использованием реактива Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Day, Мюнхен, Германия) и бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Измерения проводились в трех независимых повторностях, при этом в качестве указанного результата приводилось среднее значение из трех повторностей.

*Анализ свертываемости молока*

Анализ свертываемости молока проводился в соответствии с [23]. В качестве контрольного субстрата использовали сухое коровье обезжиренное молоко и сухое, лиофильно высушенное, обезжиренное козье молоко, 12% (в/о) суспендировали в 0,025 М натрий-ацетатном буфере, pH 6,0. Ферментативные реакции проводились как минимум в трех повторностях, при 37°C в пробирках с 20 мкл раствора фермента и 1 мл субстрата. Молочные сгустки визуализировали, переворачивая пробирки вверх дном. Одна единица молокосвертывающей активности определялась как количество фермента, необходимое для свертывания 1 мл субстрата за 40 минут при 37°C. Единицы активности химозина (Ед) рассчитывали по следующему уравнению (1):

$$Ед = \frac{V_{milk}}{V_{chymosin}} \times \frac{2400}{T_{mc}} \quad (1)$$

где:

$V_{milk}$  – объем молока (мл),

$V_{chymosin}$  – объем добавленного химозина (мл),

$T_{mc}$  – время свертывания молока (сек).

Для анализа свертываемости молока использовали сублимированное кобылье молоко (ТОО «СаумалБиоТех», Казахстан). Сухое молоко восстанавливали на 20% в деионизированной воде, предварительно нагретой до 40°C, обезжиривали центрифугированием при 3000 × g в течение 15 мин (Eppendorf Centrifuge 5415R, Hamburg, Germany). Окончательный состав раствора субстрата был приведен к следующему: 10% кобыльего молока, 0,2М буферный раствор с соответствующим pH, 30 мМ CaCl<sub>2</sub>. Очищенный рекомбинантный верблюжий химозин разбавляли до 50 нг/мкл для коровьего молока и до 2 мкг/мкл для кобыльего молока 10 мМ натрий-ацетатным буфером (pH 5,5) и 10 мкл фермента инкубировали с 1 мл молочного субстрата при 37°C. Для коровьего и козьего молока время свертывания в каждой пробирке измеряли по времени появления первых хлопьев, наблюдаемых при переворачивании пробирки. Для кобыльего молока реакцию в каждой временной точке (интервал 15 секунд) останавливали добавлением пепстатина А в конечной концентрации в пробирке 50 мкг. Остановленную реакцию затем центрифугировали при 3500 × g в течение 3 мин для разделения осажденного казеина. Время появления просветления надосадочной жидкости регистрировали как время свертывания.



*Выделение и очистка рекомбинантного верблюжьего химозина*

Рекомбинантный верблюжий химозин очищали из культуры дрожжей с помощью ионообменной хроматографии. Рекомбинантную культуру дрожжей выращивали в 200 мл среды на среде, содержащей 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 3% глюкозы, 100 мМ цитрат-фосфатный буфер pH 4,0, 10 мМ аскорбиновой кислоты, 5% сорбитола, 10 г/л свекловичной мелассы в колбах в течение 120 часов при 28°C и 250 об/мин. Клетки собирали центрифугированием при 3500×g, +4°C в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через 0,22 мкм и повышали pH до 4,5 с помощью 25 мМ ацетата натрия и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 часов. Объем раствора с помощью 25 мМ ацетата натрия доводили до 600 мл, а pH понижали до 3,0 с помощью HCl. Смесь загружали в колонку с DEAE-сефарозой, уравновешенной 25 мМ NaCl в 50 мМ цитрат-натриевом буфере (pH 3,0). Образец, прошедший сквозь колонку собирали и загружали в колонку с SP-сефарозой, уравновешенной 25 мМ NaCl в 50 мМ натрий-цитратном буфере (pH 3,0). Колонку промывали 5 мл 25 мМ NaCl в 50 мМ натрий-цитратном буфере (pH 3,0) и 15 мл 50 мМ NaCl в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5). Далее, колонку промывали 750 мМ NaCl в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5) и элюировали белок фракционированием. Фракции проверяли на молокосвертывающую активность, положительные фракции объединяли и доводили концентрацию NaCl до 25 мМ с помощью 25 мМ натрий-ацетатным буфером (pH 5,5) и загружали в колонку с Q-сефарозой, уравновешенной 25 мМ NaCl в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5). Колонку промывали 25 мМ NaCl в 25 мМ буфере ацетата натрия (pH 5,5) и элюировали химозин градиентом 50-2000 мМ NaCl в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5). Фракции анализировали с помощью SDS-PAGE. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Лэммли [24] в ячейке miniProtean-IV (Bio-Rad Laboratories Inc).

*Измерение оптимального pH субстрата для активности свертывания молока*

Для этого сухое обезжиренное молоко растворяли в 200 мМ натрий-цитратном буфере (pH 3,0-3,5), 200 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 4,0-5,5), 200 мМ имидазоловом буфере (pH 6,0-6,5) или 200 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,0-8,0).

Молочные растворы помещали в качестве субстрата в пробирки объемом 2 мл. Максимальная активность фермента определялась как 100% активность, и остальные образцы оценивались на основании этого.

*Определение оптимальной температуры для активности свертывания молока*

Активность свертывания молока измеряли в диапазоне температур 0-70°C (с интервалом 5°C) в 200 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,0) для кобыльего молока. Растворы субстрата и фермента предварительно нагревали до температуры реакции в течение 5 минут, после чего растворы смешивали. Максимальная активность фермента определялась как 100% активность, и остальные образцы оценивались на основании этого.

*Коагуляция козьего молока*

Молоко в объеме 6 литров прогревали до температуры 37 °C в сыроварне и добавляли культуру мезофильных лактобактерий, вносили сухой препарат рекомбинантного верблюжьего химозина в количестве 200 мг и инкубировали в течение 30 минут. Как только образовывался сгусток его разрезали сырным ножом на кубики размером 2×2 см и проводили отделение сыворотки от сгустка, путем вымешивания в течение 15 минут. Сырную массу наносили в форму и проводили самопрессование сыра в течение 18 часов при температуре 32°C. Сформировавшуюся сырную головку выдерживали в рассоле (1,5% NaCl) в течение 120 часов при температуре 4°C. Просоленный сыр заворачивали в пергамент и выдерживали при температуре 8°C в течение 28 суток.

*Программное обеспечение и статистический анализ*

Все анализы проводились в трех независимых повторностях. В количественном исследовании средние значения и стандартные отклонения были получены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism Version 8.0.1 в данной работе. Среднее значение активности фермента было показано, другие значения были представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD; n = 3). Расчет молекулярной массы белка, изоэлектрической точки, чтение нуклеотидной последовательности и дизайн праймеров и другие манипуляции проводили с использованием программного обеспечения Vector NTI Advance 11 и SnapGene Viewer 5.2.4.

## Результаты и обсуждение

### Структура химозина

Химозин относится к аспаргиновым протеазам специфического действия [25]. Верблюжий химозин из *Camelus bactrianus* имеет протяженность 381 аминокислотных остатка, из которых первые 16 а.о. (MRCLVVLLAALALSQA) являются секреторным пептидом (Pre-peptide) обеспечивающим секрецию фермента в желудок. Последующие 42 а.о. (SGITRIPLHKGKTLRKALKERGLLEDLQRQQYAVSSKYSSL) являются пропептидом (Pro-peptide), функциональным действием которого является блокирование протеолитического действия фермента. Следующие 323 а.о. начиная с Gly<sup>59</sup> кодируют собственно сам фермент химозин в изоформе Б, которая более активна чем изоформа А [23]. Первоначально, химозин секретируется в инактивированной форме – прохимозина и затем путем автокаталитического протеолиза при низком значении рН (4,0) активируется в белок химозин с молекулярной массой 35,5 кДа. Сравнение последовательностей химозинов коровы (*Bos taurus*), козы (*Capra hircus*), овца (*Ovis aries*) и двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) показывает достаточно высокую консервативность химозина (Рисунок 1).

Идентичность относительно хорошо изученного телячьего химозина с верблюжьим химозином составляет почти 84%. Путем клонирования прохимозина в составе челночного дрожжевого вектора собрана генно-инженерная конструкция рGAPZα/ProchymCB (Рисунок 2), получение которой подробно описано в [18].

Общая протяженность вектора составляет 4202 п.о. В составе данного вектора ген прохимозина (1098 п.о.) встроен под контроль конститутивного глицероальдегид-3-фосфат дегидрагеназы (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAP) промотора. С N-конца ген прохимозина несет нуклеотидную последовательность α-пептида из *Saccharomyces cerevisiae* для секреции прохимозина в культуральную среду дрожжей. Трансформацией данным вектором компетентных клеток дрожжей *Pichia pastoris* штамма GS115 получен дрожжевой штамм-продуцент

рекомбинантного прохимозина *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB.

### Получение химозина

Дрожжевой штамм *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB показал хорошую продуцирующую способность на среде с добавлением аскорбиновой кислоты и свекловичной мелассы. Выход активных единиц составил 1411 Ед/мл, что на 40% превышает при использовании известной среды YPD, обычно используемой для культивирования дрожжей. Предлагаемая компанией Invitrogen базальная солевая среда используется для получения культур высокой плотности, однако она не всегда является подходящим дополнением из-за чрезмерной ионной силы, выпадения в осадок добавок среды и несбалансированной концентрации питательных веществ [26]. Данная среда малоприспособлена для крупномасштабного использования недорогих биопрепаратов, так как требует добавления дорогостоящего витамина Н и смеси микроэлементов, ряд которых могут ингибировать производство рекомбинантных белков [27]. Глюкоза в среде необходима не только как источник углерода, но и для активации промотора GAP [28]. Дрожжевой экстракт и пептон являются источником амидного азота, который необходим для полноценного и устойчивого роста штамма [29]. Оптимальным рН среды для производства химозина является рН 4,0 и его поддерживали с помощью цитрат-фосфатного буфера.

Комбинация анионообменной и катионообменной хроматографии позволила очистить химозин из среды и сконцентрировать рекомбинантный белок. Путем расчета было установлено, что зрелый химозин имеет изоэлектрическую точку равной 4,87 и не связывается с DEAE-сефарозой и связывается с SP-сефарозой при рН 3,0 и с Q-сефарозой при рН 5,5 (Рисунок 3).

Как показано на рисунке 3, рекомбинантный химозин, очищенный на колонке SP-Sepharose содержит большое количество примесных белков массой ниже 30 кДа. Дальнейшая очистка на Q-сефарозе позволила сконцентрировать химозин и избавиться от других белков получая до 95%-ой степени чистоты фермент.

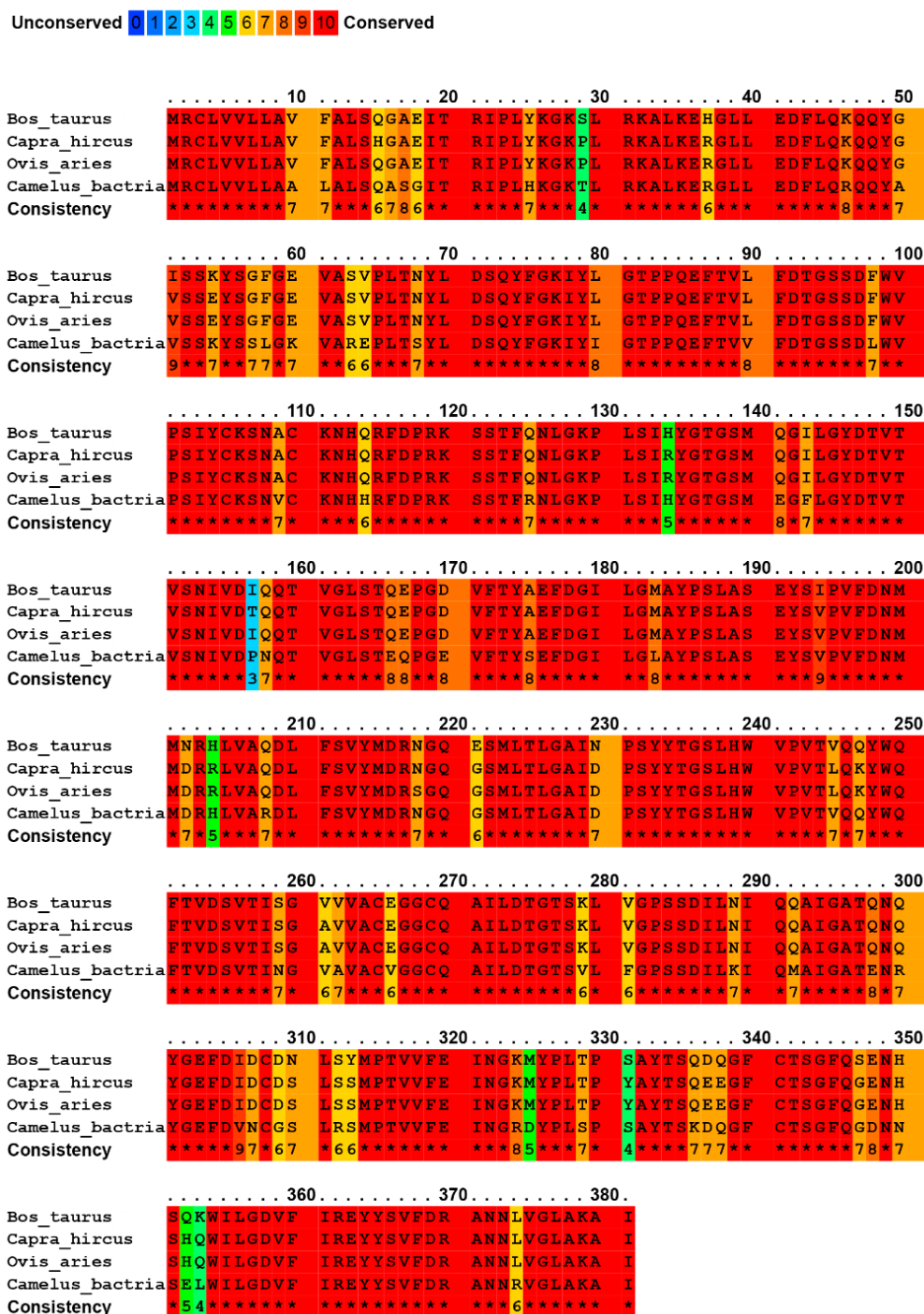


Рисунок 1 – Последовательности химозинов *Bos taurus* (NP\_851337.1), *Capra hircus* (NP\_001272688.1), *Ovis aries* (NP\_001009804.1), *Camelus bactrianus* (XP\_010946582.1)

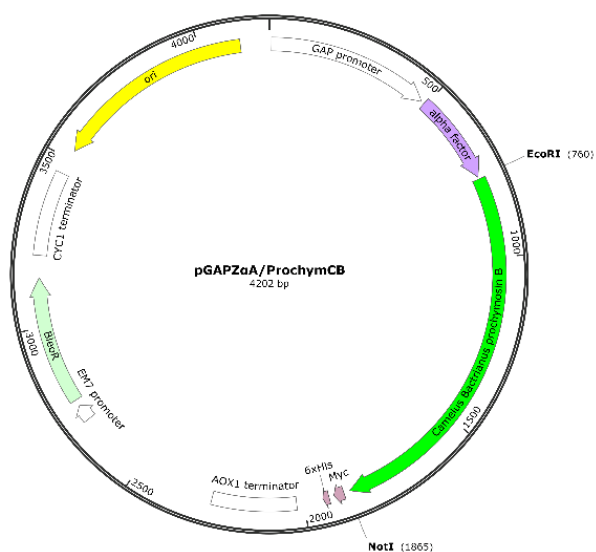
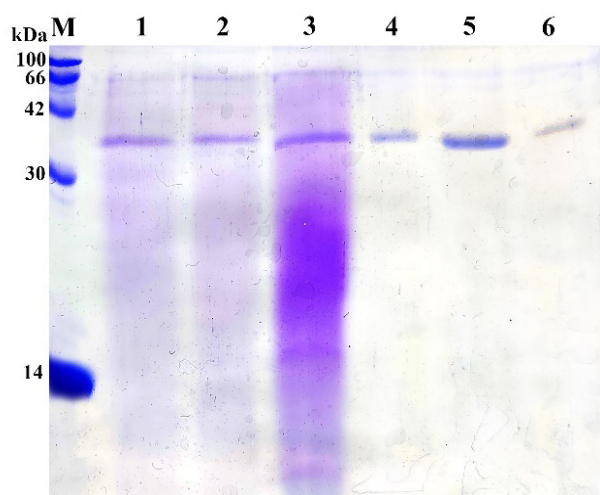


Рисунок 2 – Плазмидная карта вектора pGAPZαA/ProchymCB



М – белковый маркер; 1- Сконцентрированная культуральная жидкость; 2 – Фракция не связавшаяся с DEAE-сефарозой; 3 – элюированная фракция с SP-сефарозы; 4-6 фракции элюированные с Q-сефарозы.

Рисунок 3 – Результат очистки рекомбинантного верблюжьего химозина

*Молокосвертывающая активность химозина для кобыльего молока*

В кобыльем молоке активность химозина наблюдалась только в диапазоне pH 3,0-5,5. Оптимальный pH для активности рекомбинантного химозина *S. bactrianus* для кобыльего молока составил 4.0 (Рисунок 4). С повышением и уменьшением pH относительная активность

свертывания снижалась. Более низкие значения pH для молока из-за его кислотной коагуляции [20] не могли быть достигнуты, а при более высоких значениях pH коагуляция не наблюдалась. В случае же с козым молоком наивысшая активность достигается при pH 4.5. Эти данные показали, что верблюжий химозин, как и другие химозины, обладает наибольшей активностью в кислых условиях.

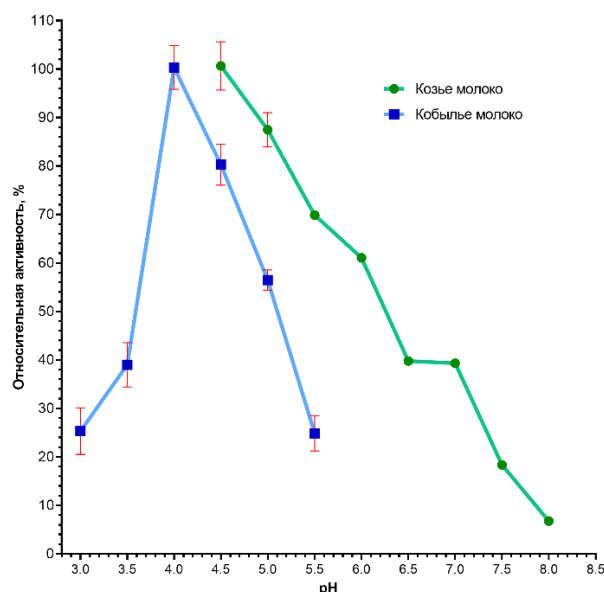
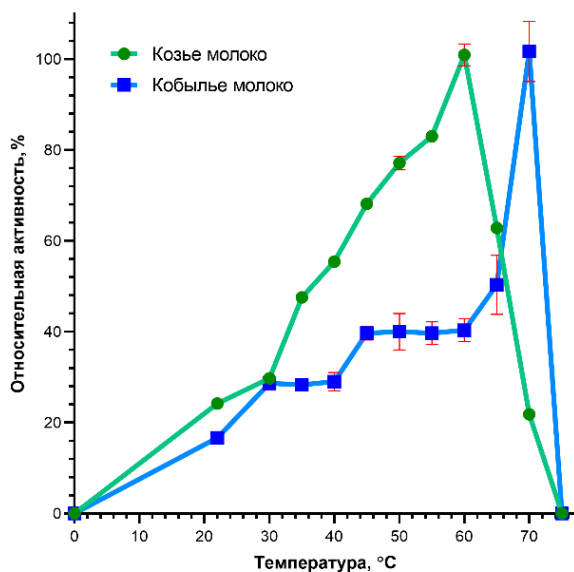


Рисунок 4 – Зависимость молокосвертывающей активности рекомбинантного химозина верблюда от pH кобыльего молока

Известно, что на молокосвертывающую активность химозина сильно влияет температура [15, 17, 30]. В нашем исследовании было установлено, что оптимальная температура для относительной активности свертывания кобыльего молока является 70°C (Рисунок 5). В данном случае скорость реакции при 70°C на кобыльем молоке увеличилась в три раза по сравнению с физиологической температурой 37°C. Для сравнения оптимальной температурой для свертывания козьего молока верблюжьим химозином составляет 60°C. При 70°C активность химозина на коровьем молоке снижается до 20%, в то время как на кобыльем молоке она достигает максимума. Различные значения оптимальной температуры для двух субстратов (козье и кобылье молоко) мы связываем с различными механизмами действия верблюжьего химозина. В козьем молоке основным субстратом для хими-



зина является каппа-казеин, который обеспечивает стабильность казеиновых мицелл [31], а для кобыльего молока, которое является альбуминовым, каппа-казеин не играет такой ключевой роли [32] и в этом случае все компоненты молока подвергаются протеолизу. Кобылье молоко имеет индуцированную химозином систему свертывания, которая, вероятно, отличается от коровьего молока.



**Рисунок 5** – Зависимость молокосвертывающей активности рекомбинантного химозина верблюда от температуры кобыльего молока

Кобылье молоко плохо поддается коагуляции. В частности, его совершенно невозможно свернуть с помощью телячьего химозина. Несмотря на то, что экспериментально было показано, что верблюжий химозин обладает молокосвертывающей активностью в отношении кобыльего молока для получения сырного сгустка из кобыльего молока требуются дополнительные технологические процедуры: смешивание с другими видами молока, оптимизация температуры и времени коагуляции [20].

#### *Коагуляция коровьего и козьего молока*

В отличие от кобыльего молока коровье и козье молоко гораздо лучше поддается свертыванию. Активность рекомбинантного верблюжьего химозина в отношении коровьего и козьего молока составила 9605 и 4650 ед/мг, соответственно, что в 80 и 40 раз превышает аналогичный показатель для кобыльего молока (Таблица 1).

**Таблица 1** – Молокосвертывающая активность рекомбинантного верблюжьего химозина в отношении кобыльего, коровьего и козьего молока

Молоко	Активность
Кобылье	123 ед/мг
Коровье	9605 ед/мг
Козье	4650 ед/мг

В ходе экспериментальных исследований установлено, что при соблюдении следующих параметров: 30 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 5.5, 37 °C эффективно протекает процесс коагуляции козьего молока. Сгусток образуется на 30 минуте (Рисунок 6).



**Рисунок 6** – Коагуляция козьего молока под действием рекомбинантного верблюжьего химозина

Органолептические свойства сгустка соответствовали мягким сортам сыра, что соответствует требованиям для сыроварения. Масса полученного бруска сыра составила 936 грамм,



что соответствует 15% от начальной массы молока.

Таким образом, экспериментально показано, что полученный верблюжий химозин обладает достаточной молокосвертывающей активностью в отношении коровьего и козьего молока и имеет перспективу использования для получения творога и сыра.

### Заключение

Путем использования модифицированных дрожжей *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchumCB получен рекомбинантный химозин двугорбого верблюда *Camelus bactrianus*, который был очищен из культуры дрожжей методами ионнообменной хроматографии. Рекомбинант-

ный верблюжий химозин обладает молокосвертывающей активностью в отношении коровьего, козьего и кобыльего молока. На козьем молоке показана коагуляционная активность, достаточная для получения творога и сыра. Полученный рекомбинантный верблюжий химозин имеет перспективу применения в технологиях переработки коровьего и козьего молока и получения сыра.

### Благодарность, конфликт интересов

Проведенные исследования были финансированы Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (BR10764998). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Литература

- 1 Szecsi, P. B. 1992. "The aspartic proteases." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* no. 210:5-22.
- 2 Foltmann, B. 1966. "A review on prorennin and rennin." *C R Trav Lab Carlsberg* no. 35 (8):143-231.
- 3 Rawlings, Neil D., Alan J. Barrett, and Alex Bateman. 2010. "MEROPS: the peptidase database." *Nucleic acids research* no. 38 (Database issue):D227-D233. doi: 10.1093/nar/gkp971.
- 4 Mohanty, A. K., U. K. Mukhopadhyay, S. Grover, and V. K. Batish. 1999. "Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture." *Biotechnol Adv* no. 17 (2-3):205-17.
- 5 Flamm, E. L. 1991. "How FDA approved chymosin: a case history." *Biotechnology (N Y)* no. 9 (4):349-51.
- 6 Johnson, M. E. 2017. "A 100-Year Review: Cheese production and quality." *J Dairy Sci* no. 100 (12):9952-9965. doi: 10.3168/jds.2017-12979.
- 7 Ersöz, F., and M. İnan. 2019. "Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* no. 154:126-133. doi: 10.1016/j.pep.2018.10.007.
- 8 Belenkaya, S. V., A. A. Bondar, T. A. Kurgina, V. V. Elchaninov, A. Y. Bakulina, E. A. Rukhlova, O. I. Lavrik, A. A. Ilyichev, and D. N. Shcherbakov. 2020. "Characterization of the Altai Maral Chymosin Gene, Production of a Chymosin Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System, and Analysis of Its Several Biochemical Properties." *Biochemistry (Mosc)* no. 85 (7):781-791. doi: 10.1134/s0006297920070068.
- 9 Bansal, N., M. A. Drake, P. Piraino, M. L. Broe, M. Harboe, P. F. Fox, and P. L. H. McSweeney. 2009. "Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese." *International Dairy Journal* no. 19 (9):510-517. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.010>.
- 10 Moynihan, A. C., S. Govindasamy-Lucey, J. J. Jaeggi, M. E. Johnson, J. A. Lucey, and P. L. McSweeney. 2014. "Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese." *J Dairy Sci* no. 97 (1):85-96. doi: 10.3168/jds.2013-7081.
- 11 Langholm Jensen, J., A. Mølgaard, J. C. Navarro Poulsen, M. K. Harboe, J. B. Simonsen, A. M. Lorentzen, K. Hjernø, J. M. van den Brink, K. B. Qvist, and S. Larsen. 2013. "Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* no. 69 (Pt 5):901-13. doi: 10.1107/s0907444913003260.
- 12 Gumus, P., and A. A. Hayaloglu. 2019. "Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of Beyaz peynir." *J Dairy Sci* no. 102 (7):5945-5956. doi: 10.3168/jds.2018-15671.
- 13 Al-Zoreky, N. S., and F. S. Almathen. 2021. "Using recombinant camel chymosin to make white soft cheese from camel milk." *Food Chem* no. 337:127994. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127994.
- 14 Bekele, B., E. B. Hansen, M. Eshetu, R. Ipsen, and Y. Hailu. 2019. "Effect of starter cultures on properties of soft white cheese made from camel (*Camelus dromedarius*) milk." *J Dairy Sci* no. 102 (2):1108-1115. doi: 10.3168/jds.2018-15084.
- 15 Kappeler, S. R., H. J. van den Brink, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah, Z. Puhani, E. B. Hansen, and E. Johansen. 2006. "Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk." *Biochem Biophys Res Commun* no. 342 (2):647-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.014.
- 16 Jensen, J. L., J. Jacobsen, M. L. Moss, F. Rasmussen, K. B. Qvist, S. Larsen, and J. M. van den Brink. 2015. "The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay." *J Dairy Sci* no. 98 (5):2853-60. doi: 10.3168/jds.2014-8672.

- 17 Wang, N., K. Y. Wang, G. Li, W. Guo, and D. Liu. 2015. "Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* no. 111:75-81. doi: 10.1016/j.pep.2015.03.012.
- 18 Akishev, Z., A. Kiribayeva, A. Mussakhmetov, K. Baltin, Y. Ramankulov, and B. Khassenov. 2021. "Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*." *Heliyon* no. 7 (5):e07137. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07137.
- 19 Küçükçetin, Ahmet, H. Yaygin, J. Hinrichs, and Ulrich Kulozik. 2003. "Adaptation of bovine milk towards mares' milk composition by means of membrane technology for koumiss manufacture." *International Dairy Journal* no. 13:945-951. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00143-2.
- 20 Uniacke-Lowe, Therese. 2011. *Studies on Equine Milk and Comparative Studies on Equine and Bovine Milk Systems*.
- 21 Faccia, M., A. G. D'Alessandro, A. Summer, and Y. Hailu. 2020. "Milk Products from Minor Dairy Species: A Review." *Animals (Basel)* no. 10 (8). doi: 10.3390/ani10081260.
- 22 Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* no. 72:248-54.
- 23 Ageitos, J. M., J. A. Vallejo, A. B. Sestelo, M. Poza, and T. G. Villa. 2007. "Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13." *J Appl Microbiol* no. 103 (6):2205-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03460.x.
- 24 Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* no. 227 (5259):680-5.
- 25 Visser, S., C. J. Slangen, and P. J. van Rooijen. 1987. "Peptide substrates for chymosin (rennin). Interaction sites in kappa-casein-related sequences located outside the (103-108)-hexapeptide region that fits into the enzyme's active-site cleft." *Biochem J* no. 244 (3):553-8.
- 26 Cos, O., R. Ramón, J. L. Montesinos, and F. Valero. 2006. "Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review." *Microb Cell Fact* no. 5:17. doi: 10.1186/1475-2859-5-17.
- 27 Jiang, X. P., M. L. Yin, P. Chen, and Q. Yang. 2012. "Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115." *World J Microbiol Biotechnol* no. 28 (5):2087-93. doi: 10.1007/s11274-012-1012-7.
- 28 Waterham, H. R., M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair, and J. M. Cregg. 1997. "Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter." *Gene* no. 186 (1):37-44. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00675-0.
- 29 Kingston, D., G. F. Novelli, P. Cerrutti, M. N. Recupero, M. Blasco, and M. A. Galvagno. 2014. "Use of grape pomaces to produce biomass of *Komagataella pastoris* strain expressing a bovine chymosin activity." *Food Sci Nutr* no. 2 (6):734-43. doi: 10.1002/fsn3.128.
- 30 Nosedá, D. G., M. N. Recupero, M. Blasco, G. E. Ortiz, and M. A. Galvagno. 2013. "Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter." *Protein Expr Purif* no. 92 (2):235-44. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.018.
- 31 Carlson, A., C. G. Hill, Jr., and N. F. Olson. 1987. "Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation." *Biotechnol Bioeng* no. 29 (5):582-9. doi: 10.1002/bit.260290507.
- 32 Uniacke-Lowe, Therese, Thom Huppertz, and Patrick F. Fox. 2010. "Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance." *International Dairy Journal* no. 20 (9):609-629. doi: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.007.

## References

- 1 Ageitos, J. M., J. A. Vallejo, A. B. Sestelo, M. Poza, and T. G. Villa. 2007. "Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13." *J Appl Microbiol* no. 103 (6):2205-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03460.x.
- 2 Akishev, Z., A. Kiribayeva, A. Mussakhmetov, K. Baltin, Y. Ramankulov, and B. Khassenov. 2021. "Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*." *Heliyon* no. 7 (5):e07137. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07137.
- 3 Al-Zoreky, N. S., and F. S. Almathen. 2021. "Using recombinant camel chymosin to make white soft cheese from camel milk." *Food Chem* no. 337:127994. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127994.
- 4 Bansal, N., M. A. Drake, P. Piraino, M. L. Broe, M. Harboe, P. F. Fox, and P. L. H. McSweeney. 2009. "Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese." *International Dairy Journal* no. 19 (9):510-517. doi: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.010.
- 5 Bekele, B., E. B. Hansen, M. Eshetu, R. Ipsen, and Y. Hailu. 2019. "Effect of starter cultures on properties of soft white cheese made from camel (*Camelus dromedarius*) milk." *J Dairy Sci* no. 102 (2):1108-1115. doi: 10.3168/jds.2018-15084.
- 6 Belenkaya, S. V., A. A. Bondar, T. A. Kurgina, V. V. Elchaninov, A. Y. Bakulina, E. A. Rukhlova, O. I. Lavrik, A. A. Ilyichev, and D. N. Shcherbakov. 2020. "Characterization of the Altai Maral Chymosin Gene, Production of a Chymosin Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System, and Analysis of Its Several Biochemical Properties." *Biochemistry (Mosc)* no. 85 (7):781-791. doi: 10.1134/S0006297920070068.
- 7 Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* no. 72:248-54.
- 8 Carlson, A., C. G. Hill, Jr., and N. F. Olson. 1987. "Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation." *Biotechnol Bioeng* no. 29 (5):582-9. doi: 10.1002/bit.260290507.
- 9 Cos, O., R. Ramón, J. L. Montesinos, and F. Valero. 2006. "Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review." *Microb Cell Fact* no. 5:17. doi: 10.1186/1475-2859-5-17.

- 10 Ersöz, F., and M. İnan. 2019. "Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* no. 154:126-133. doi: 10.1016/j.pep.2018.10.007.
- 11 Faccia, M., A. G. D'Alessandro, A. Summer, and Y. Hailu. 2020. "Milk Products from Minor Dairy Species: A Review." *Animals (Basel)* no. 10 (8). doi: 10.3390/ani10081260.
- 12 Flamm, E. L. 1991. "How FDA approved chymosin: a case history." *Biotechnology (N Y)* no. 9 (4):349-51.
- 13 Foltmann, B. 1966. "A review on prorennin and rennin." *C R Trav Lab Carlsberg* no. 35 (8):143-231.
- 14 Gumus, P., and A. A. Hayaloglu. 2019. "Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of Beyaz peynir." *J Dairy Sci* no. 102 (7):5945-5956. doi: 10.3168/jds.2018-15671.
- 15 Jensen, J. L., J. Jacobsen, M. L. Moss, F. Rasmussen, K. B. Qvist, S. Larsen, and J. M. van den Brink. 2015. "The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay." *J Dairy Sci* no. 98 (5):2853-60. doi: 10.3168/jds.2014-8672.
- 16 Jiang, X. P., M. L. Yin, P. Chen, and Q. Yang. 2012. "Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115." *World J Microbiol Biotechnol* no. 28 (5):2087-93. doi: 10.1007/s11274-012-1012-7.
- 17 Johnson, M. E. 2017. "A 100-Year Review: Cheese production and quality." *J Dairy Sci* no. 100 (12):9952-9965. doi: 10.3168/jds.2017-12979.
- 18 Kappeler, S. R., H. J. van den Brink, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah, Z. Puhan, E. B. Hansen, and E. Johansen. 2006. "Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk." *Biochem Biophys Res Commun* no. 342 (2):647-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.014.
- 19 Kingston, D., G. F. Novelli, P. Cerrutti, M. N. Recupero, M. Blasco, and M. A. Galvagno. 2014. "Use of grape pomaces to produce biomass of a *Komagataella pastoris* strain expressing a bovine chymosin activity." *Food Sci Nutr* no. 2 (6):734-43. doi: 10.1002/fsn3.128.
- 20 Küçükçetin, Ahmet, H. Yaygin, J. Hinrichs, and Ulrich Kulozik. 2003. "Adaptation of bovine milk towards mares' milk composition by means of membrane technology for koumiss manufacture." *International Dairy Journal* no. 13:945-951. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00143-2.
- 21 Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* no. 227 (5259):680-5.
- 22 Langholm Jensen, J., A. Mølgaard, J. C. Navarro Poulsen, M. K. Harboe, J. B. Simonsen, A. M. Lorentzen, K. Hjernø, J. M. van den Brink, K. B. Qvist, and S. Larsen. 2013. "Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* no. 69 (Pt 5):901-13. doi: 10.1107/s0907444913003260.
- 23 Mohanty, A. K., U. K. Mukhopadhyay, S. Grover, and V. K. Batish. 1999. "Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture." *Biotechnol Adv* no. 17 (2-3):205-17.
- 24 Moynihan, A. C., S. Govindasamy-Lucey, J. J. Jaeggi, M. E. Johnson, J. A. Lucey, and P. L. McSweeney. 2014. "Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese." *J Dairy Sci* no. 97 (1):85-96. doi: 10.3168/jds.2013-7081.
- 25 Nosedá, D. G., M. N. Recupero, M. Blasco, G. E. Ortiz, and M. A. Galvagno. 2013. "Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter." *Protein Expr Purif* no. 92 (2):235-44. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.018.
- 26 Rawlings, Neil D., Alan J. Barrett, and Alex Bateman. 2010. "MEROPS: the peptidase database." *Nucleic acids research* no. 38 (Database issue):D227-D233. doi: 10.1093/nar/gkp971.
- 27 Szecsi, P. B. 1992. "The aspartic proteases." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* no. 210:5-22.
- 28 Uniacke-Lowe, Therese, Thom Huppertz, and Patrick F. Fox. 2010. "Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance." *International Dairy Journal* no. 20 (9):609-629. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.007>.
- 29 Uniacke-Lowe, Therese. 2011. *Studies on Equine Milk and Comparative Studies on Equine and Bovine Milk Systems*.
- 30 Visser, S., C. J. Slangen, and P. J. van Rooijen. 1987. "Peptide substrates for chymosin (rennin). Interaction sites in kappa-casein-related sequences located outside the (103-108)-hexapeptide region that fits into the enzyme's active-site cleft." *Biochem J* no. 244 (3):553-8.
- 31 Wang, N., K. Y. Wang, G. Li, W. Guo, and D. Liu. 2015. "Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* no. 111:75-81. doi: 10.1016/j.pep.2015.03.012.
- 32 Waterham, H. R., M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair, and J. M. Cregg. 1997. "Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter." *Gene* no. 186 (1):37-44. doi: 10.1016/s0378-1119(96)00675-0.

Т. Доолоткелдиева<sup>ID</sup>, С. Жолдошбекова<sup>ID</sup>, Э. Исмаилова<sup>ID</sup>

Кыргызско-Турецкий Университет Манас, Кыргызстан, г. Бишкек  
e-mail: [tdoolotkeldieva@gmail.com](mailto:tdoolotkeldieva@gmail.com)

## БИОТЕСТИРОВАНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ *BEAUVERIA BASSIANA* ПРОТИВ БЕЛОКРЫЛКИ (*Trialeurodes vaporariorum*): ЛАБОРАТОРНЫЕ И ПОЛЕВЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ

В настоящем исследовании проводился поиск состава дешевых питательных сред и выращивание на них местных изолятов *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Clavicipitaceae), выделенных их разных природных источников Кыргызстана. Для выращивания биомассы из штаммов *Beauveria bassiana* в лабораторных условиях и определения ее энтомопатогенной активности были использованы отходы пищевой промышленности: гороховая крупа, овсяная крупа и соевая мука. Штаммы 501 Bb, 502Bb и 503Bb дали хороший рост мицелия и конидионошение на поверхности овсяной крупы и горохой крупы, при подсчете образующихся конидий в 1г полученной биомассы, плотность конидий составила в течение 15 дней  $1.2-1.4 \times 10^9$  спор/мл. Слабый рост был отмечен на соевой муке, количество конидий составила  $1.0 \times 10^4$  спор/мл. Результаты *in vitro* биотестирования полученных биопрепаратов на гороховой и овсяной крупе показали, что из всех испытанных штаммов, 502Bb проявил более высокую эффективность в отношении обеих стадий вредителя ( $92.00 \pm 1.13\%$  у личинок и  $65.0 \pm 0.89\%$  у имаго,  $P \leq 0.05$ ) при дозе  $1 \times 10^9$  конидий/мл.

При двухкратном опрыскивании тепличных растений огурцов суспензией препарата, содержащей  $2.2 \times 10^9$  конидий в 1 мл г гибель личинок доходила до  $80 \pm 1.41\%$ , а имаго до  $71 \pm 1.13\%$  при использовании биопродукта на основе штамма 502Bb, при опрыскивании суспензией биопродукта на основе 501Bb и 503 Bb смертность личинок составила  $76 \pm 1.27\%$ , имаго –  $65 \pm 1.15\%$ ;  $77 \pm 1.17\%$  личинок и  $67 \pm 1.23\%$  имаго соответственно ( $P \leq 0.05$ ). Полученные результаты подтверждают, что внедрение этих патогенных грибов как агенты биологической борьбы с этими вредителем спасут посевов от неизбирательного применения химических инсектицидов, внесет значимый вклад в защиту окружающей среды и полезных компонентов природы от чрезмерного загрязнения пестицидами.

**Ключевые слова** : биологические агенты, энтомопатогенные грибы, сосущие вредители, биоконтроль

T. Doolotkeldieva, S. Zholdosbekova, E. Ismailova

Kyrgyz-Turkish Manas University, Kyrgyzstan, Bishkek  
e-mail: [tdoolotkeldieva@gmail.com](mailto:tdoolotkeldieva@gmail.com)

### Biotesting of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* against the whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*): laboratory and field experiments

In the present study, we searched for the composition of cheap nutrient media. We grew local isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Clavicipitaceae) isolated from various natural sources in Kyrgyzstan. To produce biomass from strains of *Beauveria bassiana* in laboratory conditions and determine its entomopathogenic activity, food industry wastes were used: pea groats, oatmeal and soy flour. Strains 501Bb, 502Bb and 503Bb gave a tremendous growth of mycelium and conidia formation on the surface of oatmeal and pea groats when counting the resulting conidia in 1g of the biomass, the density of conidia was  $1.2-1.4 \times 10^9$  spores/ml within 15 days. Weak growth was noted on soy flour; conidia was  $1.0 \times 10^4$  spores/ml. The results of *in vitro* bio testing of the obtained biological preparations on pea and oat groats showed that of all tested strains, 502Bb showed higher efficiency against both stages of the pest ( $92.00 \pm 1.13\%$  in larvae and  $65.0 \pm 0.89\%$  in adults,  $P \leq 0.05$ ) at a dose of  $1 \times 10^9$  conidia/ml.

When greenhouse cucumber plants were sprayed twice with a suspension of the bioproduct containing  $2.2 \times 10^9$  conidia per ml, the death of larvae reached  $80 \pm 1.41\%$ , adults up to  $71 \pm 1.13\%$  when using a bioproduct based on strain 502Bb, when spraying with a suspension of bioproduct based on 501Bb and 503Bb larval mortality was  $76 \pm 1.27\%$ , adults –  $65 \pm 1.15\%$ ;  $77 \pm 1.17\%$  larvae and  $67 \pm 1.23\%$  adults, respectively ( $P \leq 0.05$ ). The results obtained confirm that introducing these pathogenic



fungi as agents of biological control against these pests will save crops from the indiscriminate use of chemical insecticides and will significantly contribute to the protection of the environment and valuable components of nature from excessive pesticide pollution.

**Key words:** biological agents, entomopathogenic fungi, sucking pests, biocontrol

Т. Доолоткелдиева, С. Жолдошбекова, Э. Исмаилова

Қырғыз-түрік «Манас» университеті, Қырғызстан, Бішкек қ.

e-mail: tdoolotkeldieva@gmail.com

***Beauveria bassiana* энтомопатогенді саңырауқұлақтарын ақ шыбынға  
(*Trialeurodes vaporariorum*) қарсы биотестілеу:  
зертханалық және далалық тәжірибелер**

Бұл зерттеуде біз арзан қоректік орталардың құрамын іздедік және оларда Қырғызстанның әртүрлі табиғи көздерінен оқшауланған *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Clavicipitaceae) жергілікті изоляттарын өсірдік. Зертханалық жағдайда *Beauveria bassiana* штамдарынан биомасса өсіру және оның энтомопатогендік белсенділігін анықтау үшін тамақ өнеркәсібінің қалдықтары: бұршақ жармасы, сұлы жармасы және соя ұны пайдаланылды. 501 Bb, 502 Bb және 503 Bb штамдары сұлы жармасы мен бұршақ жармасының бетінде мицелий мен конидионның жақсы өсуін берді, алынған биомассаның 1г алынған конидийлерді санағанда конидийлердің тығыздығы  $1,2-1,4 \times 10^9$  спора/мл болды. Соя ұнында әлсіз өсу байқалды, конидия саны  $1,0 \times 10^4$  спора/мл. Алынған биологиялық препараттарды бұршақ және сұлы жармасы бойынша *in vitro* биотестілеу нәтижелері барлық тексерілген штамдардың ішінде 502Bb зиянкестердің екі сатысына да жоғары тиімділік көрсеткенін көрсетті (личинкаларда  $92,00 \pm 1,13\%$  және ересектерде  $65,0 \pm 0,89\%$ ,  $P \leq 0,05$ )  $1 \times 10^9$  конидия/мл дозада. Жылыжайлық қияр өсімдіктеріне  $2,2 \times 10^9$  конидиялы мл г препарат суспензиясымен екі рет бүрку кезінде дернәсілдердің өлімі  $80 \pm 1,41\%$ , ал ересектерде 502Bb штамм негізіндегі биоөнімдерді қолданғанда  $71 \pm 1,13\%$  дейін, бүрку кезінде. 501Bb және 503Bb негізіндегі биоөнім суспензиясымен дернәсілдердің өлімі  $76 \pm 1,27\%$ , ересектер –  $65 \pm 1,15\%$  құрады;  $77 \pm 1,17\%$  дернәсіл және  $67 \pm 1,23\%$  ересектер ( $P \leq 0,05$ ). Алынған нәтижелер осы патогенді саңырауқұлақтарды осы зиянкестерге қарсы биологиялық күрес құралдары ретінде енгізу ауылшаруашылық дақылдарын химиялық инсектицидтерді ретсіз пайдаланудан құтқаратынын және қоршаған ортаны және табиғаттың пайдалы компоненттерін шамадан тыс пестицидтерден қорғауға елеулі үлес қосатынын растайды.

**Түйін сөздер:** биологиялық агенттер, энтомопатогенді саңырауқұлақтар, сорғыш зиянкестер, биобақылау

## 1. Введение

Насекомые-вредители являются одним из наиболее важных факторов, ограничивающих урожайности сельскохозяйственных культур. Ежегодно белокрылка (*Trialeurodes vaporariorum*, *Aleyrodidae*) наносит значительный ущерб в тепличным культурам. Это мелкое насекомое размером от 1,3 до 1,8 мм с двумя парами белых крыльев, покрытых мучнистым налётом, питается соком растений, находится на карантине в нескольких странах мира. Известные виды: оранжерейной, цитрусовой и розовой бабочки, которые широко распространены на территории СНГ. В закрытом грунте этот вредитель активно развивается в течение всех сезонов, в открытом грунте сохраняется в южных районах [19, 11].

Химические системно-контактного действия препараты важны для эффективной борьбы с белокрылкой во многих частях мира, но их не-

избирательное использование позволило насекомым выработать устойчивость ко многим химическим инсектицидам. Кроме того, неразумное использование химических инсектицидов привело к повышенному загрязнению окружающей среды и вредному воздействию на здоровье человека и нецелевые организмы [3]. По этим причинам энтомопатогенные грибы, в том числе *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Clavicipitaceae) представляют интерес как альтернативные средства борьбы с насекомыми-вредителями. Эти грибы могут вызывать микозы и поражать около 700 видов вредных насекомых из различных отрядов (чешуекрылых, равнокрылых, перепончатокрылых, жесткокрылых, двукрылых и др.) [4, 25, 2, 14].

Виды *Beauveria bassiana*, в отличие от бактерий и вирусы, могут проникать и заражать насекомых, непосредственно через их кутикулярный покров, разрушая кутикулярные компоненты с помощью продуцируемых ими ферментов- про-



теазы, эстеразы, липазы и хитиназы [16, 13, 20, 23]. Грибы вторгаются в гемоцель насекомого через поврежденный покров, где споры прорастают в гифы или более коротких гифальных тел, используют питательные вещества гемолимфы для дальнейшего размножения, выделяя ряд токсинов, которые в конечном итоге убивают насекомых. Из-за истощения гемоцельных питательных веществ, гифы появляются и конидируют на поверхности трупа насекомого, что приводит к мумификации насекомого-хозяина, пораженный вредитель снаружи покрывается белым пушистым налетом, состоящим из многочисленных конидионосцев с конидиями [7, 22].

Однако для возникновения инфекции требуется относительно большая инфекционная нагрузка (2-6 млрд спор/г). Поэтому в естественных условиях этот гриб не наносит значительного вреда. Его эффективность возрастает при ухудшении физиологического состояния особей и при повышенной влажности окружающей среды. Для создания биопрепаратов на основе *Beauveria bassiana* с титром не меньше 2-млд. спор, необходим отбор компонентов дешевых питательных сред, отвечающих всем физиологическим потребностям этого гриба и обеспечивающих массового выхода конидий в грамме питательной среды [8, 12].

В настоящем исследовании проводился поиск состава дешевых питательных сред и выращивание на них местных изолятов *Beauveria bassiana*, выделенных из разных природных источников и хранившихся в лабораторной коллекции отделения Защиты Растений Кыргызско-Турецкого Университета «Манас».

Основной целью исследования явилось изучение энтомопатогенной активности лабораторных образцов биопродуктов полученных на основе изолятов *Beauveria bassiana* в отношении личиночной стадии и имаго белокрылки в лабораторных опытах и в тепличных условиях на огурцах.

## 2. Материал и методы

### 2.1. Искользованные в биотестировании штаммы *Beauveria bassiana*

Для лабораторных испытаний и в тепличных экспериментах 3 штамма *Beauveria bassiana* (501 Bb, 502 Bb и 503 Bb) были использованы. Они имели свое происхождение из

естественнопогибших насекомых, найденных в природе: 501 Bb изолят был выделен из трупов личинок проволочника (*Agriotes mancus* (Say)); 502 Bb изолят из трупов личинок большой восковой моли (*Galleria melonella*); 503 Bb изолят из погибших особей имаго колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*). Культуры вышеуказанных штаммов хранились при температуре 4 °C на агаровой среде Чапека (Сахароза-20,0 г; NaNO<sub>3</sub> -2г; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -1г; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-0,5 г; KCl-0,5 г; FeSO<sub>4</sub> -0,01 г; агар-20г; дист. вода – 1000 мл).

### 2.2. Подбор недорогих питательных сред, отвечающих физиологическим требованиям штаммов *Beauveria bassiana*

Для выращивания биомассы из штаммов *Beauveria bassiana* в лабораторных условиях и определения ее энтомопатогенной активности были использованы отходы пищевой промышленности: гороховая крупа, овсяная крупа и соевая мука. Эти растительные отходы стерилизовали в автоклаве хорошо, так как они содержат много другой ненужной микрофлоры. После дополнительной автоклавной обработки пищевые среды сушили в сушильном шкафу при 120-140°C для дополнительной стерилизации. Готовые пищевые среды распределяли в стерильные посуды слоем 5-10 см. Для инокуляции подготовленной среды готовили инокулянт из *Beauveria bassiana* штаммов, выращенных предварительно в жидкой модифицированной среде Чапека (кормовые дрожжи – 15г; сахароза – 3,0г; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,3г; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,1г; MgSO<sub>4</sub> – 0,05г; KCl – 0,05г; ZnSO<sub>4</sub> – 0,002г; KI – 0,003г; FeSO<sub>4</sub> – следы; вода – 100 мл) на шейкере (Шейкер-инкубатор ES-20/8, BIOSAN, USA) в течение 48 часов. Через 2 дня количество спор в 1 мл жидкости, измеряли с помощью спектрофотометра (UV/VIS, Jenway, Stone, UK) при 600 nm. Готовые инокулянты содержащие 1x10<sup>9</sup> спор/мл вносили в подготовленные среды из пищевых отходов, перемешали хорошо для равномерного распределения спор штаммов *Beauveria bassiana* на всех слоях питательной среды и выращивали в течение 14 дней. Через день встряхивали посуды для равномерного распределения и аэрации развивающийся мицелий в среде (рис.1).

### 2.3. Биотестирование биопрепаратов *Beauveria bassiana* в лабораторных условиях.

Из мицелийсодержащей сухой биомассы штаммов готовили суспензии в теплой стериль-

ной воде с добавлением 0.01% Twin 80 и суспензии разбавляли до концентрации  $1 \times 10^9$  конидий/мл после определения концентрации путем подсчета конидий в /мл с помощью гемоцитометра. По 1 мл конидиальной суспензии каждого изолята наносили на диски из фильтровальной бумаги (диаметр 9 см) в чашках Петри. Листья огурца с заселенными личинками и имаго белокрылки (приблизительно по 30 экз.) помещали в чашку Петри и опрыскивали еще с 1мл суспензией биопрепарата. Таким образом, в каждую чашку вносили по 2мл суспензии содержащей  $1 \times 10^9$  конидий/мл энтомопатогенного гриба. Опыты проводились в трех повторностях. В контроле подопытные насекомые опрыскивали теплой стерильной водой. Ежедневно проводили наблюдение за развитием микоза на подопытных насекомых и за влажностью в чашках Петри. Чтобы создавать влажные условия для прорастания конидий гриба, по мере уменьшения влажности дополнительно опрыскивали стерильной водой фильтровальную бумагу. Смертность насекомых учитывали в течение 7 суток.

#### 2.4. Биотестирование биопрепаратов *Beauveria bassiana* в теплице на огурцах.

Отвешивали 20 г штаммов *Beauveria bassiana*, выращенных на твердом пищевом отходе, смешивали с теплой дистиллированной водой и готовили специальную суспензию ( $2.2 \times 10^9$  конидий/мл). Приготовленной суспензией опрыскивали нижнюю и верхнюю поверхности листьев огурца с заселенными колониями специальным распылителем обильно, чтобы стекала жидкость по краям листовой пластинки. Для каждого штамма по 5 растений, расположенных изолировано друг от друга были использованы. Растений заворачивали в специальную тонкую марлю, чтобы белокрылки не летели с других растений. Количество погибших и ослабленных особей (личинок и взрослых особей) в сутки на 10 листьях с каждого растения определяли визуализацией с помощью микроскопа. Для каждого листа внимательно осматривали верхнюю и нижнюю стороны и подсчитывали насекомых в каждой категории (мертвые, больные и явно здоровые насекомые) в течение 10-дневного периода (Рис.2).

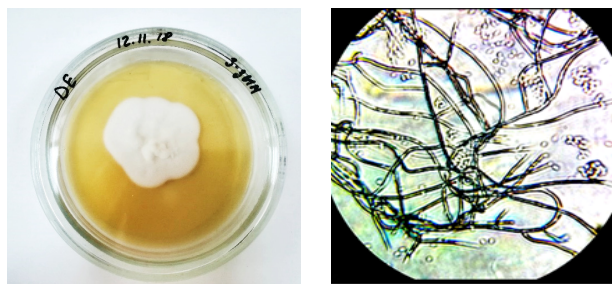


Рисунок 1 – Схема получения лабораторных образцов биопрепарата на основе *Beauveria bassiana* на пищевых отходах



Рисунок 2 – Проведение опрыскивание суспензией биопрепаратов на основе *Beauveria bassiana* против оранжерейной белокрылки на огурцах в тепличных условиях





**Рисунок 3** – Колонии на среде Чапека и микроскопическая картина (x100) конидиофоров и конидий изолятов *Beauveria bassiana*

*Статистические обработки данных.* Данные о смертности, полученные в ходе исследования, были нормализованы с использованием преобразования квадратного корня и подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA). Нетрансформированные средние значения представлены здесь как значения  $P: P \leq 0.05$  считались статистически значимыми (программное обеспечение STATISTICAR 6.0).

Снимки бактериальных клеток получали с помощью камеры для микроскопии (Motic Images Plus, версия 2.0 ML, краткое руководство пользователя, Составные биологические микроскопы серии 163).

### 3. Результаты и обсуждение

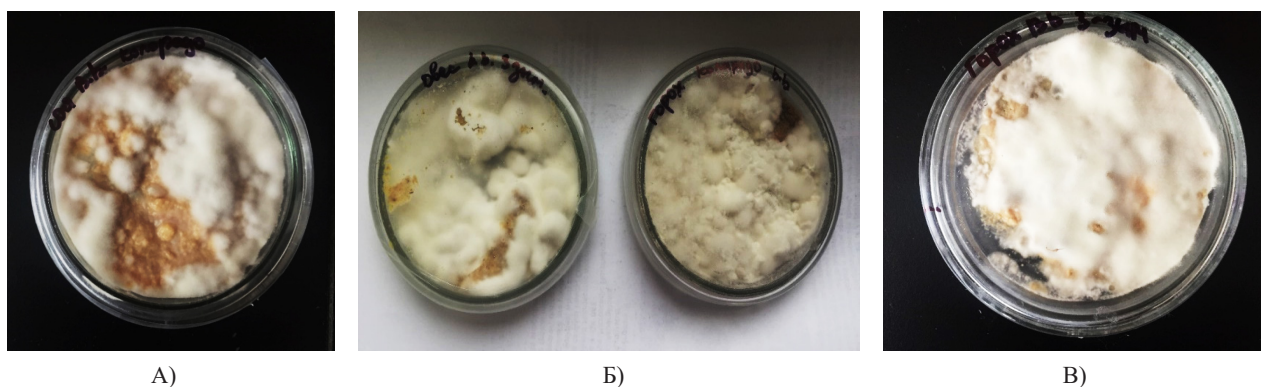
#### 3.1. Краткая характеристика штаммов *Beauveria bassiana*

Использованные в эксперименте изоляты *Beauveria bassiana* хорошо росли на среде Чапека, образуя плотные хлопковидные воздушные конидии бело-серого или бело-желтого цвета при 28 °С. У всех изолятов четко выделялись конидио-

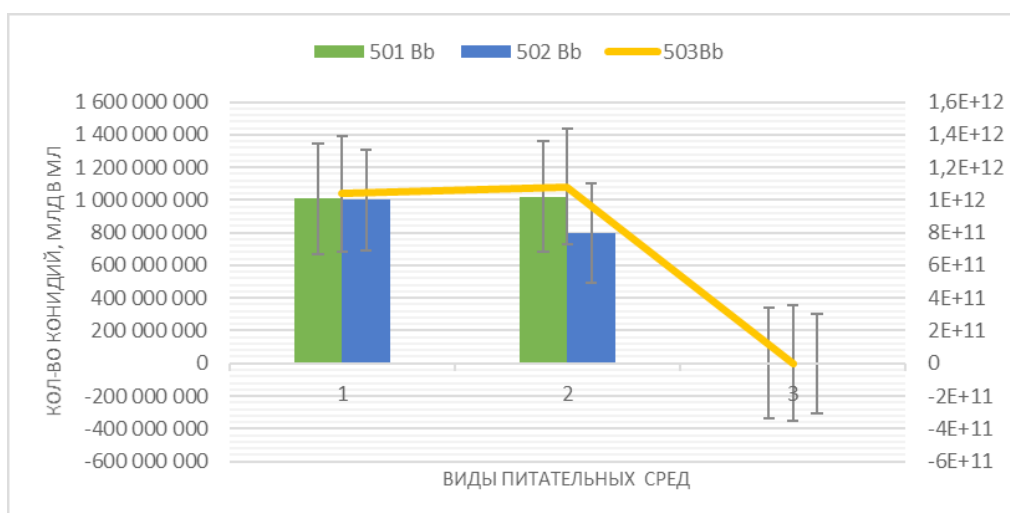
офоры, состоящие из мутовок и плотных скоплений симподиальных, коротких и шаровидных конидиогенных клеток с зигзагообразным видом на вершине и одноклеточных сферических конидий.

#### 3.2. Подбор недорогих питательных сред, отвечающих физиологическим требованиям штаммов *Beauveria bassiana*

Проверяли скорость роста каждого штамма на субстратах пищевого отхода и использование их грибами в качестве пищи. Было обнаружено, что штаммы *Beauveria bassiana* хорошо растут на гороховой крупе, полностью покрывая данную среду и образуя плотный ватообразный мицелий с конидиями. А также грибы хорошо использовали для своего развития и освяную муку, а в соевой муке они дали слабый рост (Рис.4). Штаммы 501 Вв, 502Вв и 503Вв дали хороший рост мицелия и конидионошение на поверхности овсяной крупы и горохой крупы, при подсчете образующихся конидий в 1г полученной биомассы, плотность конидий составила в течение 15 дней  $1.2-1.4 \times 10^9$  спор/мл. Слабый рост был отмечен на соевой муке, количество конидий составила  $1.0 \times 10^4$  спор/мл (Рис.5).



**Рисунок 4** – Рост мицелий грибов на поверхности пищевых отходов в течение 12 дней а) на овсяной крупе б) на горохой крупе, в) на соевой муке

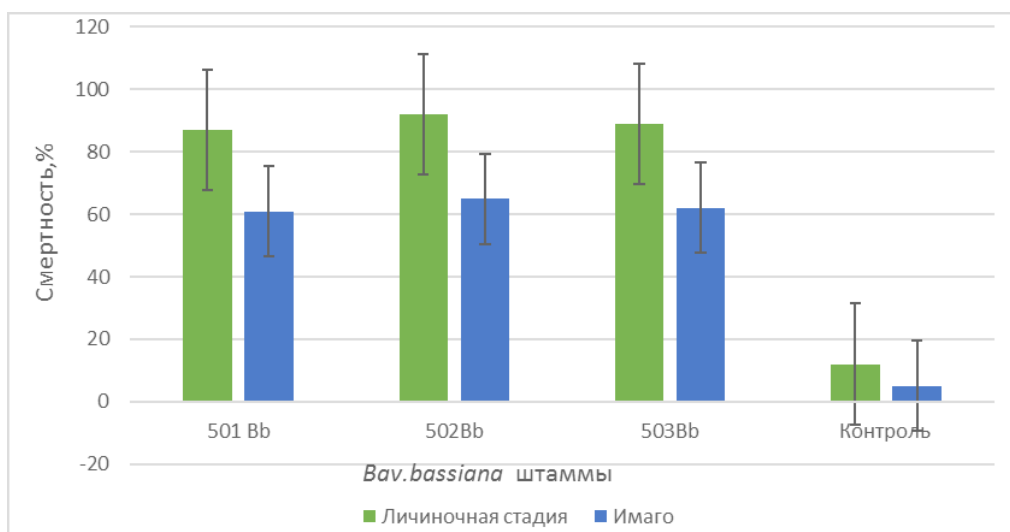


**Рисунок 5** – Рост штаммов *Beauveria bassiana* образование конидий на поверхности: 1 – овсяной крупы; 2 – гороховой крупы; 3 – соевой муки

### 3.3. Биотестирование биопрепаратов *Beauveria bassiana* в лабораторных условиях.

Результаты *in vitro* биотестирования полученных биопрепаратов на гороховой и овсяной крупе показали, что в течение 7 суток все три штамма проявили значительную активность в отношении личинок и имаго белокрылки. Смертность личинок при применении биопродукта на основе штамма 501Bb составила  $87.0 \pm 1.02$ ; при воздействии биопродукта на основе штамма 502Bb гибель личинок доходила  $92.00 \pm 1.13$ ; а при применении

503Bb биопродукта –  $89.05 \pm 1.19$  ( $P \leq 0.05$ ). В то же время смертность имаго вредителя была ниже чем у личинок, так при воздействии биопродукта на основе штамма 501Bb составила  $61.0 \pm 0.92$ ; при опрыскивании суспензией биопродукта 502Bb –  $65.0 \pm 0.89$ ; при 503Bb  $-62.0 \pm 0.82$  ( $P \leq 0.05$ ). Из всех испытанных штаммов, 502Bb проявил более высокую эффективность в отношении обеих стадий вредителя. В контрольном варианте опыта смертность составила  $12 \pm 0.07\%$  у личинок и  $5,0 \pm 0.03\%$  у имаго ( $P \leq 0.05$ ) (Рис.6).

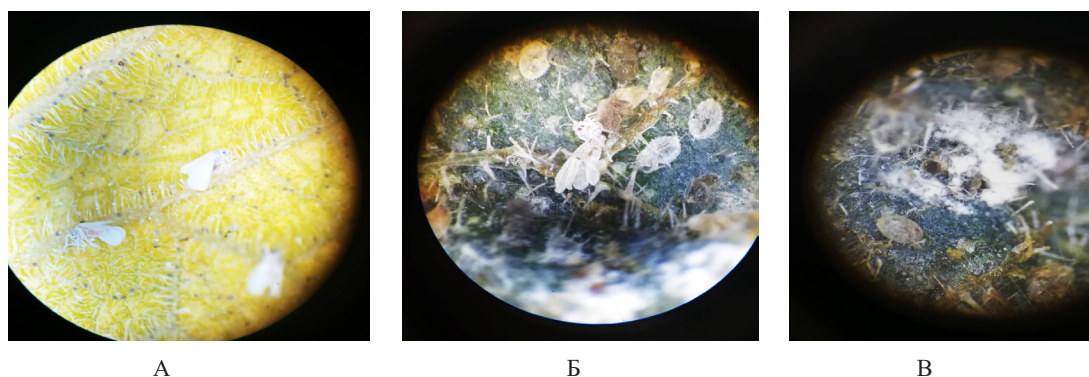


**Рисунок 6** – Биоинсектицидная активность штаммов *Beauveria bassiana* в отношении личинок и имаго белокрылки (*Trialeurodes vaporariorum*) *in vitro* условиях, за 7 суток

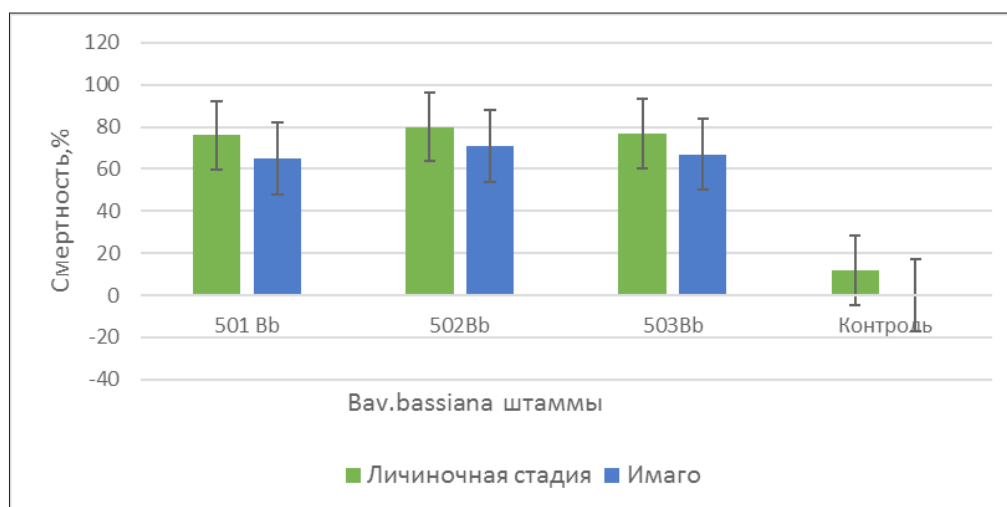
#### 2.4. Биотестирование биопрепаратов *Beauveria bassiana* в теплице на огурцах.

При опрыскивании тепличных растений огурцов суспензией препарата, содержащей  $2 \cdot 10^9$  конидий в мл через 3 дня наблюдалось заметное уменьшение летающих имаго на нижней стороне листьев растений. Учитывали количество погибших и ослабленных особей под микроскопом (Рис.7) ежедневно в течение 10 суток. При однократном опрыскивании гибель насекомых доходила до  $45-50 \pm 1.35\%$  при влажности 60% внутри теплицы. Для повышения эффективности энтомопатогенного гриба необходимо поддерживать влажности до 80%. Через 10 дней проводили второе обильное опрыскивание содержащей  $2.2 \cdot 10^9$  конидий в мл. Через трое суток после второй обработки

гибель личинок доходила до  $80 \pm 1.41\%$ , а имаго до  $71 \pm 1.13\%$  при использовании биопродукта на основе штамма 502Bb, при опрыскивании суспензией биопродукта на основе 501Bb и 503Bb смертность личинок составила  $76 \pm 1.27\%$ , имаго –  $65 \pm 1.15\%$ ;  $77 \pm 1.17\%$  личинок и  $67 \pm 1.23\%$  имаго соответственно ( $P \leq 0.05$ ). В контрольном варианте опыта смертность составила  $10 \pm 0.13\%$  у личинок и  $2,0 \pm 0.05\%$  у имаго ( $P \leq 0.05$ ). При полевых условиях штамм 502Bb также показал более высокую эффективность по сравнению с остальными протестированными штаммами. Таким образом, результаты показали, что для достижения высокой эффективности в полевых условиях необходимо создавать достаточную влажность и повторность обработки (Рис.8).



**Рисунок 7** – Картины под микроскопом (x40): А- ослабленные и погибшие имаго, покрытие белым мицелием гриба; Б- личинки погибшие, покрытие мицелием гриба; В- полностью покрытие мицелием гриба трупы насекомых.



**Рисунок 8** – Биоинсектицидная активность штаммов *Beauveria bassiana* в отношении личинок и имаго белокрылки (*Trialeurodes vaporariorum*) *in vivo* условиях, за 13 суток после двукратной обработки



Таким образом, полученные нами результаты подтверждают данные других исследований. К примеру по исследованиям авторов [13], при испытании трех концентраций инокулята *B. bassiana* против *T. vaporariorum* (низкая,  $9 \times 10^9$ ; средняя,  $6,24 \times 10^{10}$ ; и высокая,  $2 \times 10^{11}$  конидий  $^{-1}$  инокулята) вызывали гибель у 18, 54 и 56% взрослых особей и 17, 29. и 32% для нимфальной стадии у вредителя соответственно, средняя концентрация была выбрана как оптимальная, поскольку она обеспечивала наилучшую борьбу с вредителем. А также вирулентность двадцать пять аборигенных изолятов *B. bassiana* для борьбы с белокрылкой была оценена по отношению к нимфам четвертой стадии в концентрации  $1 \times 10^7$  конидий /мл. Все изоляты были патогенны для *Trialeurodes vaporariorum*, при этом показатели смертности варьировали от 3 до 85%. На основании их вирулентности и температурных требований три изолята показали себя многообещающими в качестве кандидатов для борьбы с белокрылкой в средиземноморских теплицах [18]. В другом исследовании два энтомопатогенных гриба, *Beauveria bassiana* и *Verticillium lecanii*, были проверены на их эффективность против белокрылки. Смертность от *B. bassiana* была выше, чем от *V. lecanii*. Смертность, вызванная по фильтра-там были значительно выше, чем по конидиям обоих грибов [24]. Естественная смертность в популяции белокрылки была зарегистрирована из-за энтомопатогенных грибов, преимущественно *Aschersonia spp.*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium spp.* [1]. Среди них *B. bassiana* является наиболее распространенным и легкодоступным видом [6, 20, 15, 5, 9] для борьбы с белокрылкой и тлей.

## Заключение (Қорытынды, Conclusion)

В данном исследовании были подобраны дешевые питательные среды для производства биомассы природных энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana*, что имеет ценное практическое значение для получения импорт замещающих местных биологических средств защиты растений против сосущих вредителей тепличных культур с низкой себестоимостью. Определены дозы и кратности применения биопрепарата в тепличных условиях. Было показано, что заражение насекомых энтомопатогенным грибом происходит только в определенных условиях влажности. Протестированные местные штаммы *Beauveria bassiana* могут быть рекомендованы для создания на их основе биологических препаратов для борьбы с опасным сосущим вредителем как белокрылка.

## Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

## Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке Национальной программы грантов Кыргызстана на 2020-2021 годы. Финансирование предоставлено Министерством образования и науки Республики Кыргызстан в рамках бюджетной программы 001 «Научная и / или техническая деятельность» и подпрограммы «Грантовое финансирование научных исследований», договор № 119 от 20 февраля 2020 года

## Литература

- 1 Shcherbakov D. The most primitive whiteflies (Hemiptera; Aleyrodidae; Bernaeinae subfam. nov.) from the Mesozoic of Asia and Burmese amber, with an overview of Burmese amber hemipterans // Bulletin of the British Museum (Natural History). Geology. – 2000. – Vol. 56, no. 1. – P. 29–37.
- 2 Jon A. Martin & Laurence A. Mound. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae) // Zootaxa : journal. – 2007. – Vol. 1492. – P. 1–84. – ISBN 978-1-86977-112-6.
- 3 Costs of Inaction on the Sound Management of Chemicals // Electronic resource UNEP Official website. – 2013. URL: <http://www.unep.org/chemicalsandwaste/>
- 4 de Faria M. R., Wraight S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types // Biological control. – 2007. – Vol. 43. – no. 3. – P. 237–256.
- 5 Wright M. S., Lax A. R. Improved mortality of the Formosan subterranean termite by fungi, when amended with cuticle-degrading enzymes or eicosanoid biosynthesis inhibitors // Folia microbiologica. – 2016. – Vol. 61. – no. 1. – P. 73–83.
- 6 Boucias D. G. Microbiota in insect fungal pathology // Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – Vol. 102. – no. 14. – P. 5873–5888.

- 7 Ortiz-Urquiza A., Keyhani N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle //Insects. – 2013. – Vol. 4. – no. 3. – P. 357–374.
- 8 Pedrini N., Crespo R., Juárez M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi //Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. – 2007. – Vol. 146. – no. 1-2. – P. 124–137.
- 9 Pedrini N. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction //Frontiers in microbiology. – 2013. – Vol. 4. – P. 24.
- 10 Keyhani N. O. Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi //Fungal biology. – 2018. – Vol. 122. – no. 6. – P. 420–429.
- 11 St Leger R. J., Wang C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – Vol. 85. – no. 4. – P. 901–907.
- 12 Valero-Jiménez C. A. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* //Journal of Invertebrate Pathology. – 2016. – Vol. 133. – P. 41–49.
- 13 Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T.R. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilbert, L.I., Gill, S.S. (Eds.), *Insect Control: Biological and Synthetic Agents* //Academic Press, London. – 2010. – P. 387–432.
- 14 Tarocco F. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology //Applied microbiology and biotechnology. – 2005. – Vol. 68. – no. 4. – P. 481–488.
- 15 Gouli V., Gouli S., Kim J. S. Production of *Beauveria bassiana* air conidia by means of optimization of biphasic system technology //Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2014. – Vol. 57. – P. 571–577.
- 16 Kapongo J. P. Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper //BioControl. – 2008. – Vol. 53. – no. 5. – P. 797–812.
- 17 Quesada-Moraga E. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity //Biological control. – 2006. – Vol. 36. – no. 3. – P. 274–287.
- 18 Javed K. efficacy of *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* for the management of whitefly and aphid //Pakistan Journal of Agricultural Sciences. – 2019. – Vol. 56. – no. 3. P. 274–287.
- 19 Wraight, S.P., G.D. Inglis and M.S. Goettel. Fungi. In: Lacey, L.A., Kaya, H.K. (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests* // Springer, Dordrecht, the Netherlands. – 2007, – P.223–248.
- 20 Aung O. M., Soyong K., Hyde K. D. Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai Province, Thailand //Fungal Diversity. – 2008. – Vol. 30. – P. 15–22.
- 21 Glare T. et al. Have biopesticides come of age? //Trends in biotechnology. – 2012. – Vol. 30. – no. 5. – P. 250–258.
- 22 St Leger R. J., Wang C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – Vol. 85. – no. 4. – P. 901–907.
- 23 Ortiz-Urquiza A., Luo Z., Keyhani N. O. Improving mycoinsecticides for insect biological control //Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – Vol. 99. – no. 3. – P. 1057–1068.
- 24 Fan Y. Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – Vol. 114. – no. 9. – P. E1578–E1586.
- 25 Hill D. S. *Pests of crops in warmer climates and their control.* – Springer Science & Business Media, 2008.

## References

- 1 Aung O. M., Soyong K., Hyde K. D. Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai Province, Thailand //Fungal Diversity. – 2008. – Vol. 30. – P. 15–22.
- 2 Boucias D. G. Microbiota in insect fungal pathology //Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – Vol. 102. – no. 14. – P. 5873–5888.
- 3 Costs of Inaction on the Sound Management of Chemicals // Electronic resource UNEP Official website. – 2013. URL: <http://www.unep.org/chemicalsandwaste/>
- 4 de Faria M. R., Wraight S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types //Biological control. – 2007. – Vol. 43. – no. 3. – P. 237–256.
- 5 Fan Y. Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – Vol. 114. – no. 9. – P. E1578–E1586.
- 6 Glare T. Have biopesticides come of age? //Trends in biotechnology. – 2012. – Vol. 30. – no. 5. – P. 250–258.
- 7 Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T.R. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilbert, L.I., Gill, S.S. (Eds.), *Insect Control: Biological and Synthetic Agents* //Academic Press, London. – 2010. – P. 387–432.
- 8 Gouli V., Gouli S., Kim J. S. Production of *Beauveria bassiana* air conidia by means of optimization of biphasic system technology //Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2014. – Vol. 57. – P. 571–577.
- 9 Hill D. S. *Pests of crops in warmer climates and their control.* – Springer Science & Business Media, 2008.
- 10 Javed K. efficacy of *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* for the management of whitefly and aphid //Pakistan Journal of Agricultural Sciences. – 2019. – Vol. 56. – no. 3. P. 274–287.
- 11 Jon A. Martin & Laurence A. Mound. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae) // Zootaxa : journal. – 2007. – Vol. 1492. – P. 1–84. – ISBN 978-1-86977-112-6.

- 12 Kapongo J. P. Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper // *BioControl*. – 2008. – Vol. 53. – no. 5. – P. 797–812.
- 13 Keyhani N. O. Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi // *Fungal biology*. – 2018. – Vol. 122. – no. 6. – P. 420–429.
- 14 Ortiz-Urquiza A., Keyhani N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle // *Insects*. – 2013. – Vol. 4. – no. 3. – P. 357–374.
- 15 Ortiz-Urquiza A., Luo Z., Keyhani N. O. Improving mycoinsecticides for insect biological control // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2015. – Vol. 99. – no. 3. – P. 1057–1068.
- 16 Pedrini N. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction // *Frontiers in microbiology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 24.
- 17 Pedrini N., Crespo R., Juárez M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2007. – Vol. 146. – no. 1-2. – P. 124–137.
- 18 Quesada-Moraga E. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity // *Biological control*. – 2006. – Vol. 36. – no. 3. – P. 274–287.
- 19 Shcherbakov D. The most primitive whiteflies (Hemiptera; Aleyrodidae; Bernaeinae subfam. nov.) from the Mesozoic of Asia and Burmese amber, with an overview of Burmese amber hemipterans // *Bulletin of the British Museum (Natural History). Geology*. – 2000. – Vol. 56, no. 1. – P. 29–37.
- 20 St Leger R. J., Wang C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 85. – no. 4. – P. 901–907.
- 21 St Leger R. J., Wang C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 85. – no. 4. – P. 901–907.
- 22 Tarocco F. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2005. – Vol. 68. – no. 4. – P. 481–488.
- 23 Valero-Jiménez C. A. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2016. – Vol. 133. – P. 41–49.
- 24 Wraight, S.P., G.D. Inglis and M.S. Goettel. Fungi. In: Lacey, L.A., Kaya, H.K. (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests* // Springer, Dordrecht, the Netherlands. – 2007, – P.223–248.
- 25 Wright M. S., Lax A. R. Improved mortality of the Formosan subterranean termite by fungi, when amended with cuticle-degrading enzymes or eicosanoid biosynthesis inhibitors // *Folia microbiologica*. – 2016. – Vol. 61. – no. 1. – P. 73–83.

M.O. Myrzabekova<sup>1,2\*</sup> , S.B. Labeit<sup>3</sup> , X.R.Ye. Nyiazova<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Kazakh National Agrarian University, Kazakhstan, Almaty

<sup>3</sup>University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

\*e-mail: moldir.myrzabek@gmail.com

## IN SILICO IDENTIFICATION OF *EQQUUS CABALLUS* MIRNAS WITH THE POTENTIAL TO AFFECT HUMAN GENE EXPRESSION

miRNAs exist that are codified by non-human genomes but are still present in circulation. These miRNAs have been termed as xeno-miRNAs. XenomiRNAs in humans have been identified in various exogenous sources previously. The aim of this work is to identify xeno-miRNA from *Equus caballus* (domestic horse or in brief eca) which have analogs can bind to human genes. The MirTarget program was used to predict miRNA binding to human gene mRNAs. The homologs of eca-miRNAs were identified by using miRviewer online free available bioinformatic tool. It was identified 15 eca-miRNAs interacted with human mRNA genes with high complementarity,  $\Delta G/\Delta G_m$  equal to 98-100%. The characteristics of the interaction of all known eca-miRNAs with mRNAs of human genes were identified. The total number of binding sites for 469 miRNAs are 1605, from which 907 are in CDS, 451 in 3'UTR and 247 in 5'UTR. 93 miRNAs each have one-target genes, 63 miRNAs have two target genes, 67 miRNAs have three to four target genes, and 72 miRNAs have five and more target genes. The free energy of the interaction of the considered miRNAs with the mRNAs of human genes is high and varied from -110 kJ/mole to -117 kJ/mole. The homology analyses revealed 140 miRNAs candidates shown to be total identical to human miRNAs sequences.

**Key words:** miRNA, mRNA, milk, xeno-miRNA, *Equus caballus*.

М.О. Мырзабекова<sup>1,2\*</sup>, З. Лабейт<sup>3</sup>, Р.Е. Ниязова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Қазақ Ұлттық Аграрлық Зерттеу Университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup>Хайделберг Университеті, Германия, Хайделберг қ.

\*e-mail: moldir.myrzabek@gmail.com

### Адам гендерінің экспрессиясына әлеуетті әсері бар *Equus caballus* miRNA-н in silico идентификациялау

Адам геномымен кодталмайтын miRNA-лер, бірақ адам ағзасында табылған miRNA-лер бар, олар хено-miRNA-лар деп аталады. Хено-miRNA-лар адам ағзасында әр-түрлі экзогенді көздерден анықталыны. Бұл жұмыстың мақсаты аналогтары адам гендерімен байланысатын *Equus caballus* (үй жылқысы немесе қысқаша eca) хено-miRNA-ларды идентификациялау болып табылады. miRNA мен mRNA байланысуы MirTarget бағдарламасымен болжам жасалынды, eca-miRNA гомологтары желідегі қолжетімді онлайн miRviewer биоинформатикалық бағдарлама көмегімен идентификацияланды.  $\Delta G/\Delta G_m$  98-100% көрсеткіштегі адам mRNA гендерімен жоғары комплементарлықпен байланысатын 15 eca-miRNA белгілі болды. Белгілі 17508 адам mRNA гендерімен байланысатын барлық eca-miRNA мен mRNA сипаттамалары анықталды. *Equus caballus*-тың белгілі 469 miRNA-мен байланысқан жалпы байланыс сайттар саны 1605, оның ішінде 907-сі CDS-те, 451-3'UTR-де, 247-5'UTR-де орналасқан. 93 miRNA бір нысана генмен, 63 miRNA екі нысана генмен, 67 miRNA үштен төрт нысана генге дейін, ал 72 miRNA бестен көп генмен байланысты. Қарастырылған miRNA-мен mRNA бос байланыс энергия әсерлесуі жоғары -110 кДж/моль – -117 кДж/моль аралығын құрайды. Гомологиялық анализ адам miRNA-мен толықтай ұқсас 140 кандидат eca-miRNA-ді идентификациялап берді.

**Түйін сөздер:** miRNA, mRNA, сүт, хено-miRNA, *Equus caballus*.



М.О. Мырзабекова<sup>1,2\*</sup>, З. Лабейт<sup>3</sup>, Р.Е. Ниязова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский Национальный Аграрный Исследовательский Университет, Казахстан, г. Алматы

<sup>3</sup>Хайделберг Университет, Германия, г. Хайделберг

\*e-mail: moldir.myrzabek@gmail.com

### **In silico идентификация miRNA *Eqqus caballus* с потенциальным воздействием на экспрессию генов человека**

Существуют miRNA, которые не кодируются геномом человека, но обнаруживаются в организме. Их называют хено-miRNA. хено-miRNA у людей были обнаружены из различных экзогенных источников. Целью данной работы является идентификация хено-miRNA из *Eqqus caballus* (домашняя лошадь или вкратце еса), аналоги которой могут связываться с генами человека. Связывание miRNA с mRNA генов человека предсказывали с помощью программы MirTarget. Гомологи еса-miRNA были идентифицированы с помощью свободно доступного онлайн-биоинформатического метода miRviewer. Было идентифицировано 15 еса-miRNA, взаимодействующих с генами mRNA человека с высокой комплементарностью, с  $\Delta C/\Delta Gm$  равной 98-100%. Выявлены характеристики взаимодействия всех известных еса-miRNA с mRNA генов человека. Общее количество сайтов связывания для 469 miRNA составляет 1605, из которых 907 находятся в CDS, 451 – в 3'UTR и 247 – в 5'UTR. 93 miRNA имеют по одному гену-мишени, 63 miRNA имеют по два гена-мишени, 67 miRNA имеют от трех до четырех генов-мишеней, а 72 miRNA имеют пять и более генов-мишеней. Свободная энергия взаимодействия рассматриваемых miRNA с mRNA генов человека высока и варьирует от -110 кДж / моль до -117 кДж / моль. Анализ гомологии выявил 140 кандидатных еса-miRNA, которые оказались полностью идентичными последовательностям miRNA человека.

**Ключевые слова:** miRNA, mRNA, молоко, хено-miRNA, *Eqqus caballus*.

#### **Abbreviations**

miRNA – microRNA;  
 xeno-miRNA – xenomiRs;  
 NF – kB transcription factor,  
 IL2 – interleukin 2,  
 Hsa – Homo sapiens.

#### **Introduction**

MicroRNAs are defined as short, typically approximately 22 nucleotide-long noncoding RNAs. Mechanistically, they are generated by the action of ribonuclease (RNase) III Dicer activity on precursor transcripts [1, 2]. The Dicer complex's miRNAs then play an important part in the posttranscriptional control of gene expression: complementary messenger RNAs are degraded or have their translational suppression mediated by the so-called Ago-complex (mRNAs), repression can be complete or partial [1, 3].

Plants and mammals both have miRNAs. Overall, they have been predicted to control up to 60% of all human genes [4], thereby modulating virtually every aspect of human physiology and health, including cancer [5], brain development [6], fat storage [7], hematopoiesis, or immunity [8, 9, 10].

Certain presently less characterized miRNA subclasses may resist degradation in the gastro-in-

testinal tract and then be dietary taken up and further distributed by the body circulation. These miRNAs have been termed as xenomiRs. XenomiRs have been found in a variety of exogenous sources, including both human and animals sources [11]. The suspected main route of entry into human is by the diet when animal products are ingested. Exosomes containing miRNA from bovine milk, for example, have been found to penetrate the circulatory system of humans [12].

Milk is an important biological nutrient, it's the only option diet for babies that ensures their development and health in the short and long term [13, 14].

From an evolutionary perspective it is remarkable that fresh milk has been consumed for thousands of years in Central Asia and neighbouring regions. Herodotus in the 5th century BC described how Scythians used to consume it [15]. Therefore, it is conceivable that since the neolithicum cross-species co-evolutionary adaptations may have occurred between еса and human for example.

High levels of miRNAs are detected in secreted body fluids including serum, urine, saliva, seminal fluid, and milk [16, 17]. Milk-derived miRNAs are also secreted by the lactating mammary epithelial cell in exosomes, which are microvesicles of ~30–100 nm that are packaged and secreted into extracellular fluids [18]. Recently, there has been

much interest in milk-derived miRNAs as potential regulators of the neonatal gastrointestinal and immune systems [19]. MiRNAs in milk from a variety of sources animals have been detected in the same way as other bodily fluids [20, 21] milk microRNAs have paved the way for prognostic, diagnostic, and functional investigations [22], because milk is the biological fluid with the largest concentration of miRNAs [23].

## Materials and Methods

The nucleotide sequences of the 17508 mRNAs of targeted genes were downloaded from NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The nucleotide sequences of the miRNAs were taken from miRBase v.22 (<http://www.mirbase.org/>). 690 miRNAs encoded by the *Equus caballus* genome are available in the miRBase database. The miRNA BSs in the mRNAs of several genes were predicted using the MirTarget program [24, 25]. This program defines the following features of miRNA binding to mRNA: a) the initiation of the miRNA binding to the mRNAs from the first nucleotide of the mRNAs; b) the localization of the miRNA BSs in the 5'-untranslated region (5'UTR), coding domain sequence (CDS), and 3'-untranslated region (3'UTR) of the mRNAs; c) the schemes of nucleotide interactions between miRNAs and mRNAs d) the free energy of the interaction between miRNA and the mRNA ( $\Delta G$ , kJ/mole); and the ratio  $\Delta G/\Delta G_m$  (%) is determined for each site ( $\Delta G_m$  equals the free energy of the miRNA binding with its fully complementary nucleotide sequence). The MirTarget program finds hydrogen bonds between adenine (A) and uracil (U), guanine (G) and cytosine (C), G and U, and A and C. The free energy of interactions ( $\Delta G$ ) a pair of G and C is equal to 6.37 kJ/mole, a pair of A and U is equal to 4.25 kJ/mole, G and U, A and C equal to 2.12 kJ/mole [26]. The distances between the bound A and C (1.04 nm) and G and U (1.02 nm) are similar to those between bound G and C, A and U, which are equal to 1.03 nm [27, 28, 29]. The numbers of hydrogen bonds in the G–C, A–U, G–U, and A–C interactions were 3, 2, 1, and 1, respectively. By comparison, MirTarget differs from other programs in terms of finding the BSs of miRNA on the mRNAs of plant genes [30] in that 1) it takes into account the interaction of the miRNA with mRNA over the entire miRNA sequence; 2)

it takes into account non-canonical pairs G–U and A–C; and 3) it calculates the free energy of the interaction of the miRNA with mRNA, and when two or more miRNAs are bound with one mRNA or, if the BSs of two different miRNAs coincide in part, the preferred miRNA binding site is considered to be the one for which the free binding energy is greater. The adequacy of the program in terms of finding BSs has been confirmed in several publications [31, 32, 33, 34]. The MirTarget program predicts the BSs of plant and animal miRNAs equally welln [35, 36]. The horse homologs of 140 miRs were identified by using miRviewer online bioinformatic tools which defined the homolog miRNAs by integrating their molecular and structural properties with the results of the BLAST program [37].

## Results and Discussion

### *Characteristics of interactions of eca-miRNAs with human mRNA genes with high complementarity*

The table 1 shown the nucleotide sequences of eca-miR-135a, eca-miR-8915, eca-miR-151-5p, eca-miR-1905c, eca-miR-127, eca-miR-136, eca-miR-431, eca-miR-432, eca-miR-433, eca-miR-1282 and eca-miR-9046 BSs that are fully complementary to 10 mRNAs of human genes. The *RTL1* gene with  $\Delta G/\Delta G_m=100$  % with absolute conservative previously shown earlier [34]. Single miRNA eca-miR-1905a has 99% of complementarity; other miRNAs eca-miR-1905b, eca-miR-8910 and eca-miR-196a have 98% of complementarity. Mainly BSs are located in the CDS, four mRNAs have BSs in the 3'UTR and the free energy of interaction of miRNAs with mRNAs of these genes ranges from -110 to -140 kJ/mole. Seven miRNAs were identical to human miRNAs.

The interaction of nucleotides of miRNAs and mRNAs of target genes show how effectively these molecules bind. The creation of hydrogen bonds between all of the nucleotides of miRNAs and their binding sites in mRNAs is illustrates in Figure 1.

### *Characteristics of the interaction of eca-miRNAs with mRNA of human genes*

The total number of 690 miRNAs of *Equus caballus* are known in mirBase. Of the 690 known horse miRNAs 469 had BSs with human genes. All miRNAs were searched for 17 508 human target genes. The 907 BSs are located in CDS, 451 BSs are located in 3'UTR and 247 BSs in 5'UTR.



A total number of 93 miRNAs with one-target genes were identified, in this group there were several miR-3p/mir-5p pairs: eca-miR-340-3p and eca-miR-340-5p, eca-miR-508-3p and eca-miR-508-5p that originating from the same-pre-miRNA, have binding sites in mRNAs of different genes. We arranged the data into several groups: in the group of 63 miRNAs with two target genes, there were eca-miR-146b-3p and eca-miR-146-5p pairs that originated from same pre-miRNA (Table 2).

MiRNAs with three and four genes have a total of 126 target genes. A total of 67 miRNAs with three to four target genes were identified. There are 229 target genes for 67 miRNAs in total. The miRNAs number with five and more genes is 72, miRNAs with the most number of target genes are eca-miR-8989 (65 genes), eca-miR-9159 (48 genes), eca-miR-1892 (36 genes), and eca-miR-9164 (24 genes), eca-miR-324-3p (23 genes), eca-miR-326 (20 genes). The total number of target genes for

72 miRNAs is 815. Eca-miR-345-3p and eca-miR-345-5p origin same pre-miRNA. As a result, these miRNAs could drastically alter the metabolism of recipient human cells at high concentrations.

Table 2 shows the characteristics of the binding of some eca-miRNAs to mRNAs of human genes. Each of the 15 miRNAs bind to mRNAs of one target gene, eca-miR-124 has one target gene, eca-miR-1193 has two target genes, and eca-miR-107a has three target genes with a value  $\Delta G/\Delta G_m$  of 89-91%. Eca-miR-145 has four, eca-miR-296 five target genes and eca-miR-346-5p six target genes with a value  $\Delta G/\Delta G_m$  of 89-91%. The free energy of miRNA interactions with these genes' mRNAs ranged from -110 kJ/mole to -117 kJ/mole. 20 target genes are associated with eca-miR-326 with value  $\Delta G/\Delta G_m$  equal to 89-94%. The miRNAs eca-miR-146b-3p and eca-miR-146b-5p bind in CDS, 3'UTR, 5'UTR and related NF-kB signaling in innate immune responses [38].

**Table 2** – Characteristics of interaction eca-miRNAs with mRNAs of human genes

Gene	eca-miRNA	Start of site, nt	Region of miRNA	$\Delta G$ , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$ %	Length, nt
<i>ADAMTS7</i>	eca-miR-107a	1460	CDS	-110	91	23
<i>APOLD1</i>	eca-miR-107a	656	CDS	-108	89	23
<i>IGHMBP2</i>	eca-miR-107a	365	CDS	-108	89	23
<i>MGRN1</i>	eca-miR-124	4003	3'UTR	-102	92	20
<i>SNX24</i>	eca-miR-145	951	3'UTR	-110	90	23
<i>ARNTL</i>	eca-miR-145	1867	CDS	-110	90	23
<i>PRICKLE4</i>	eca-miR-145	1024	CDS	-113	91	23
<i>WWOX</i>	eca-miR-145	1154	CDS	-110	90	23
<i>CLDND1</i>	eca-miR-146b-3p	345	5'UTR	-110	91	22
<i>MIS12</i>	eca-miR-146b-3p	606	5'UTR	-110	91	22
<i>NCKAP5</i>	eca-miR-146b-5p	2404	CDS	-102	91	22
<i>MOB3C</i>	eca-miR-146b-5p	1002	3'UTR	-102	91	22
<i>ESAM</i>	eca-miR-296	1553	3'UTR	-110	90	22
<i>TMEM198</i>	eca-miR-296	1644	3'UTR	-110	90	22
<i>RNF214</i>	eca-miR-296	483	CDS	-110	90	22
<i>ZNF250</i>	eca-miR-296	983	CDS	-110	90	22
<i>ZNF598</i>	eca-miR-296	1806	CDS	-110	90	22
<i>POLR3A</i>	eca-miR-340-3p	2716	CDS	-106	89	23
<i>NCOA7</i>	eca-miR-340-5p	6034	3'UTR	-100	94	22
<i>HBZ</i>	eca-miR-345-3p	490	3'UTR	-110	90	22
<i>SCRT1</i>	eca-miR-345-3p	2699	3'UTR	-110	90	22
<i>TCL1B</i>	eca-miR-345-3p	817	3'UTR	-110	90	22



Table continuation

Gene	eca-miRNA	Start of site, nt	Region of miRNA	$\Delta G$ , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$ %	Length, nt
<i>C9orf131</i>	eca-miR-345-3p	2291	CDS	-113	91	22
<i>HRC</i>	eca-miR-345-3p	1491	CDS	-110	90	22
<i>ITGA7</i>	eca-miR-345-3p	2007	CDS	-110	90	22
<i>NOS1</i>	eca-miR-345-3p	1246	CDS	-110	90	22
<i>PRKCG</i>	eca-miR-345-3p	2247	CDS	-110	90	22
<i>PRRT3</i>	eca-miR-345-3p	1339	CDS	-110	90	22
<i>PTCHD2</i>	eca-miR-345-3p	292	CDS	-110	90	22
<i>ELFN2</i>	eca-miR-346-5p	6433	3'UTR	-115	89	23
<i>DNAJC5</i>	eca-miR-346-5p	194	5'UTR	-115	89	23
<i>NFIA</i>	eca-miR-346-5p	127	5'UTR	-115	89	23
<i>CAMSAP2</i>	eca-miR-346-5p	97	5'UTR	-117	90	23
<i>TENM4</i>	eca-miR-346-5p	35	5'UTR	-117	90	23
<i>BAI2</i>	eca-miR-346-5p	2168	CDS	-117	90	23
<i>RYBP</i>	eca-miR-508-3p	823	CDS	-104	89	23
<i>RNASEL</i>	eca-miR-508-5p	1550	CDS	-108	89	23
<i>EML4</i>	eca-miR-1193	143	5'UTR	-100	90	21
<i>SOWAHB</i>	eca-miR-1193	1911	CDS	-100	90	21
<i>APEH</i>	eca-miR-326	725	CDS	-110	91	21
<i>ATG7</i>	eca-miR-326	2928	3'UTR	-113	93	21
<i>ATXN1</i>	eca-miR-326	3622	3'UTR	-110	91	21
<i>AZI1</i>	eca-miR-326	3287	CDS	-110	91	21
<i>C2orf54</i>	eca-miR-326	2250	3'UTR	-113	93	21
<i>EHD3</i>	eca-miR-326	637	CDS	-110	91	21
<i>FGF23</i>	eca-miR-326	852	CDS	-113	93	21
<i>FZD10</i>	eca-miR-326	2236	3'UTR	-113	93	21
<i>GIGYF1</i>	eca-miR-326	4902	3'UTR	-110	91	21
<i>HEMK1</i>	eca-miR-326	703	CDS	-115	95	21
<i>KIFC2</i>	eca-miR-326	1707	CDS	-110	91	21
<i>KRBA1</i>	eca-miR-326	950	CDS	-113	93	21
<i>LOXHD1</i>	eca-miR-326	2727	CDS	-110	91	21
<i>LRRN4CL</i>	eca-miR-326	977	CDS	-113	93	21
<i>MAP1A</i>	eca-miR-326	8687	CDS	-110	91	21
<i>MYL9</i>	eca-miR-326	876	3'UTR	-110	91	21
<i>RASSF1</i>	eca-miR-326	1280	3'UTR	-110	91	21
<i>SLC22A17</i>	eca-miR-326	1570	CDS	-110	91	21
<i>STYK1</i>	eca-miR-326	1100	CDS	-110	91	21
<i>TNS1</i>	eca-miR-326	8712	3'UTR	-110	91	21
<i>CLDND1</i>	eca-miR-146b-3p	345	5'UTR	-110	91	22
<i>MIS12</i>	eca-miR-146b-3p	606	5'UTR	-110	91	22
<i>MOB3C</i>	eca-miR-146b-5p	1002	3'UTR	-102	91	22
<i>NCKAP5</i>	eca-miR-146b-5p	2404	CDS	-102	91	22

*Characteristics of the interaction of Human homologs eca miRNAs with mRNA of human genes*

In our bioinformatics analyses, we identified human homolog miRNA candidates in *Equus caballus* miRNAs. The miRviewer and miRBase pro-

gram searched homologs of this miRNAs. Our homology analyses revealed 140 miRNAs candidates shown to be 100% similar to human miRNA sequence. The list of 140 miRNAs in this study given in table 3.

**Table 3** – *Equus caballus* homologs miRNAs with human miRNAs

Horse miRNAs
<b>eca-let-7d, eca-let-7e, eca-let-7g, eca-miR-103, eca-miR-105, eca-miR-106b, eca-miR-107b, eca-miR-1185, eca-miR-122, eca-miR-125a-3p, eca-miR-125a-5p, eca-miR-125b-5p, eca-miR-1264, eca-miR-127, eca-miR-128, eca-miR-1289, eca-miR-1291a, eca-miR-1296, eca-miR-1298, eca-miR-129a-5p, eca-miR-129b-5p, eca-miR-130a, eca-miR-130b, eca-miR-132, eca-miR-133a, eca-miR-133b, eca-miR-135a, eca-miR-135b, eca-miR-141, eca-miR-145, eca-miR-146a, eca-miR-148a, eca-miR-148b-3p, eca-miR-149, eca-miR-151-5p, eca-miR-15b, eca-miR-183, eca-miR-186, eca-miR-187, eca-miR-188-3p, eca-miR-188-5p, eca-miR-18a, eca-miR-191a, eca-miR-192, eca-miR-193b, eca-miR-194, eca-miR-196a, eca-miR-196b, eca-miR-197, eca-miR-199a-5p, eca-miR-199b-5p, eca-miR-199b-3p, eca-miR-19a, eca-miR-19b, eca-miR-200b, eca-miR-205, eca-miR-20a, eca-miR-20b, eca-miR-21, eca-miR-212, eca-miR-214, eca-miR-216a, eca-miR-216b, eca-miR-217, eca-miR-221, eca-miR-222, eca-miR-223, eca-miR-23a, eca-miR-27a, eca-miR-27b, eca-miR-28-3p, eca-miR-28-5p, eca-miR-29a, eca-miR-29b, eca-miR-301a, eca-miR-301b-3p, eca-miR-302b, eca-miR-30c, eca-miR-30d, eca-miR-30e, eca-miR-31, eca-miR-323-3p, eca-miR-328, eca-miR-330, eca-miR-331, eca-miR-335, eca-miR-33b, eca-miR-346, eca-miR-34c, eca-miR-361-5p, eca-miR-370, eca-miR-376c, eca-miR-379, eca-miR-381, eca-miR-383, eca-miR-423-3p, eca-miR-423-5p, eca-miR-424, eca-miR-432, eca-miR-433, eca-miR-448, eca-miR-450a, eca-miR-454, eca-miR-485-3p, eca-miR-485-5p, eca-miR-486-5p, eca-miR-487b, eca-miR-490-5p, eca-miR-491-3p, eca-miR-491-5p, eca-miR-492, eca-miR-495, eca-miR-496, eca-miR-497, eca-miR-499-3p, eca-miR-499-5p, eca-miR-500, eca-miR-502-3p, eca-miR-502-5p, eca-miR-505, eca-miR-509-5p, eca-miR-551a, eca-miR-551b, eca-miR-582-5p, eca-miR-598, eca-miR-628a, eca-miR-652, eca-miR-671-3p, eca-miR-671-5p, eca-miR-708, eca-miR-711, eca-miR-761, eca-miR-873, eca-miR-874, eca-miR-876-5p, eca-miR-92a, eca-miR-92b, eca-miR-93, eca-miR-99b, eca-miR-99a</b>
Human miRNAs
<b>hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-105-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-1185-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-1264, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-1289, hsa-miR-1291, hsa-miR-1296-5p, hsa-miR-1298-5p, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-129-1-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-151a-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-197-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-216a-5p, hsa-miR-216b-5p, hsa-miR-217-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-33b-5p, hsa-miR-346, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-379-5p, hsa-miR-381-3p, hsa-miR-383-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-433-3p, hsa-miR-448, hsa-miR-450a-5p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-496, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-499a-3p, hsa-miR-499a-5p, hsa-miR-500a, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-505-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-598-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-652-3p, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-711, hsa-miR-761, hsa-miR-873-5p, hsa-miR-874-3p, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-99b-5p, hsa-miR-99a-5p.</b>
<b>hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-30d-5p</b> – associated with pathological and immune responses

The number of target genes for homolog miRNAs *Equus caballus* is 342. Total of 369 BSs mainly of them (239) are located in the CDS, 98 BSs in the 3'UTR, 32 BSs in the 5'UTR. MiR-

NAs bind one to 39 target genes. The miRNAs with the largest number of target genes are eca-miR-671-5p (39 genes), eca-miR-151-5p (11 genes).

Eca-miR-125a-3p and eca-miR-125a-5p; eca-miR-188-3p and eca-miR-188-5p; eca-miR-199b-3p and eca-miR-199b-5p; eca-miR-28-3p and eca-miR-28-5p; eca-miR-423-3p and eca-miR-423-5p; eca-miR-502-3p and eca-miR-502-5p; eca-miR-671-3p and eca-miR-671-5p, originating from the same pre-miRNA, have binding sites in the mRNAs of several genes.

Identical eca-miR-127, eca-miR-135a, eca-miR-196a, eca-miR-432, eca-miR-433 are fully complementary to mRNAs of *RTL1*, *GLYCTK*, *HOXB8* genes (Table 1). The *RTL1* gene binds with -123 kJ/mole.

Table 4 shown similar sequence of some eca-miRNAs, all of 140 eca-miRNAs nucleotide sequence were searched. The free energy of the miRNAs with the mRNAs of these genes chosen higher -100 kJ/mole.

We found that the major miRNAs identified in eca largely homolog with those reported in human milk. This suggests a conserved evolutionary a procedure that causes certain milk miRNAs to be released [39, 40, 41, 42, 22, 43].

Animal and human miRNAs have been identified to be homologous. Mir-155, which may be found in milk from both bovine and human sources, was sequenced and found to have a high proportion of sequence similarity. As a result, the existence of such similar miRNAs may result in observable physiological reactions. Similar sequence similarities have also been found in miR-21-5p and

miR30a-5p sequences in human and bovine samples [44].

Let-7 family members such as let-7a-5p, let-7b-5p, and let7f, as well as miR-148a, have been demonstrated to decrease the immunological response by influencing the transcription factor NFB (Table 5) were found to be conserved in humans, cows, pigs, and pandas, indicating that it plays an important role in immune modulation [42].

**Table 4** – Homolog sequence of eca and hsa miRNAs

miRNA	Sequence
<b>eca-miR-141</b>	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG
hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG
<b>eca-miR-146a</b>	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
<b>eca-miR-148a</b>	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
hsa-miR-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
<b>eca-miR-191a</b>	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG
hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG
<b>eca-miR-223</b>	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
<b>eca-miR-29a</b>	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
<b>eca-miR-29b</b>	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU

**Table 5** – Immune response of miRNAs expressed during lactation period

miRNA	Immune response	References
miR-148a-3p	Targets cancer-related (TGIF-2) and drug metabolism-related PXR genes, making it a potential biomarker for milk quality control.	[45], [46], [47]
miR-30d-5p	downstream target DRP1 promote cellular invasion and immunosuppression by direct targeting of GALNT7, increased synthesis of immunosuppressive cytokine IL-10	[48]
miR-30c-2-5p	Involved in oncogenesis and immunosuppression	[49]
miR-191-5p	Colorectal cancer biomarker, primary effusion lymphoma biomarker, hepatocellular carcinoma biomarker	[50, 51, 52]
miR-21-5p	TLR4 inhibition by targeting the tumor suppressor PDCD4 Modulation of IL-12	[53]
miR-27b-3p	Destabilization of lipopolysaccharide-mediated PPAR mRNA abundance, linked to chronic inflammatory disorders	[54]
miR-146b-5p	Innate immunological responses and NF-kB signaling	[38]

MiR223 has been found to function as a monocyte differentiation factor and to have a role in granulocyte proliferation and activation [55, 56],

miR146a is primarily involved in NF-kB-mediated inflammatory responses as well as type 1 interferon generation and signaling [57].

Other miRNAs linked to pathological and immune responses include miR-29a-3p (target interferon, suppresses immune response to intracellular pathogens), miR-141-3p (biomarker for colon cancer), and hsa-miR-223, whose targets tend to be T and granulocyte cell populations, and thus affect the developmental stage of adaptive immune response in infants [58].

The expression of hsa-miR-191-5p and the number of CD4+ T-cells were identified. miR-29b found in bovine milk tends to target the runt-related transcription factor-2 (RUNX2) [58]. Immune-related miRNAs in human breast milk contains exosomal vesicles. In mammals, miRNAs and their potential role in interindividual communication has been suggested after the demonstration of their presence in both cow and human breast milk [44].

A recently published bioinformatics analysis based on homology modelling between animal and human miRNA tried to address this issue by analyzing also the probability that xenomiR might be transported across cell membranes, thereby augmenting their potential to regulate human mRNAs [59]. In the last years, there has been a steady growth

in interest in milk miRNAs, accompanied by a persistent debate about the bioactivity of cross-species or inter-individual microRNA transfer through the diet. Certain miRNAs that are codified by non-human genomes might be ingested and then might be presented to human cells in the blood stream by circulation

## Conclusion

The obtained results indicate that *Equus caballus* have a large number of similar miRNAs with human miRNAs. The results also revealed that a single miRNA could bind to one to several mRNA target genes. In addition to the identical with human miRNAs, eca-miRNAs were found to have high complementarity with human mRNA genes. Binding sites miRNAs with high complementarity to mRNA genes were located in the CDS region.

## Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest

## References

- 1 Ambros V. The functions of animal microRNAs // Nature. – 2004. – Vol. 431, No. 7006, – P. 350–355.
- 2 Provost P., Dishart D., Doucet J., Frenedewey D., Samuelsson B., Radmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human dicer // The EMBO Journal. – 2002. – Vol. 21. No. 21. – P. 5864–5874
- 3 Meister G. Argonaute proteins: Functional insights and emerging roles // Nature Reviews Genetics. 2013.- Vol. 14. No.7. – P. 447–459.
- 4 Bartel D. P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions // Cell. – 2009. – Vol. 136. No. 2. – P. 215–233.
- 5 Feng Y., Li N., Ma H., Bei B., Han Y., Chen G. Undescribed phenylethyl flavones isolated from *patrinia villosa* show cytoprotective properties via the modulation of the mir-144-3p/nrf2 pathway // Phytochemistry. – 2018. – Vol. 153. – P. 28–35.
- 6 Meza-Sosa K. F., Pedraza-Alva G., Perez-Martinez L. MicroRNAs: Key triggers of neuronal cell fate // Frontiers in Cellular Neuroscience, – 2014. – Vol. 8. No.175.
- 7 Mysore R., Zhou Y., Sadevirta S., Savolainen-Peltonen H., Nidhina Haridas P. A., Soronen J., Olkkonen V. M. MicroRNA-192 impairs adipocyte triglyceride storage // Biochimica et Biophysica Acta, – 2016. – Vol. 1861. No. 4. – P. 342–351.
- 8 Benmoussa A., Lee C.H., Laffont B., Savard P., Laugier J., Boilard E., Provost P. Commercial dairy cow milk microRNAs resist digestion under simulated gastrointestinal tract conditions // Journal of Nutrition, -2016. -Vol. 146, No. 11. -P. 2206–2215.
- 9 Bissels U., Bosio A., Wagner W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape // Haematologica, -2012. – Vol. 97, No. 2. – P. 160–167.
- 10 O'Connell R.M., Rao D.S., Chaudhuri A.A., Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system // Nature Reviews Immunology, – 2010. – Vol.10, No.2. – P. 111–122
- 11 Li Z., Xu R., Li N. MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? // Nutr. Metab. – 2018. – Vol.15, No.68. doi: 10.1186/s12986-018-0311-x.
- 12 Izumi H., Tsuda M., Sato Y., Kosaka N., Ochiya T., Iwamoto H., Takeda Y. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages // Journal of Dairy Science, – 2015. – Vol. 98, No. 5. – P. 2920–2933.
- 13 Andreas N.J., Kampmann B., Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity // Early Human Development, – 2015. – Vol. 91. No.11. – P. 629–635.
- 14 Le Doare K., Holder B., Bassett A., Pannaraj P.S. Mother's milk: A purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. No. 361.
- 15 West S. Introducing the Scythians: Herodotus on koumiss // Museum Helveticum. – 1999. – Vol.56. – P.76–86
- 16 Cui J., Zhou B., Ross S.A., Zempleni J. Nutrition, microRNAs, and Human Health // Adv. Nutr. – 2017. – Vol. 8. – P.105–112. doi: 10.3945/an.116.013839.



- 17 Kosaka N., Izumi H., Sekine K., Ochiya T. MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk // *Silence*. - 2010. - Vol.1, No.7, doi: 10.1186/1758-907X-1-7.
- 18 Alsaweed M., Lai C.T., Hartmann P.E., Geddes D.T., Kakulas F. Human milk cells contain numerous miRNAs that may change with milk removal and regulate multiple physiological processes // *Intern. J. Molec. Sci.* - 2016. - Vol.17. No. 956. doi: 10.3390/ijms17060956
- 19 Zempleni J., Aguilar-Lozano A., Sadri M., Sukreet S., Manca S., Wu D., Mutai E. Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants // *Journal of Nutrition*. - 2017. - Vol.147. No.1. - P. 3-10
- 20 Melnik B. C. Milk: An epigenetic amplifier of FTO-mediated transcription? Implications for western diseases // *Journal of Translational Medicine*. - 2015a. - Vol.13. No. 385.
- 21 Melnik B. C., Schmitz G. MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators // *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. - 2017a - Vol.31. No. 4. - P. 427-442.
- 22 Zempleni J., Kusuma R. J., Manca S., Friemel T., Sukreet S., Nguyen C. Human vascular endothelial cells transport foreign exosomes from cow's milk by endocytosis // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. - 2016. - Vol.310. No. 10. - P.800-807.
- 23 Weber J. A., Baxter D. H., Zhang S., Huang D. Y., Huang K. H., Lee M. J., Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids // *Clinical Chemistry*. - 2010. - Vol. 56, No. 11. - P. 1733-1741.
- 24 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // *Bioinformatics*. - 2014. - Vol. 10. - P. 423-427. doi: 10.6026/97320630010423.
- 25 Ivashchenko A.T., Pyrkova A.Y., Niyazova R.Y., Alybayeva A., Baskakov K. Prediction of miRNA binding sites in mRNA // *Bioinformatics* 12. - 2016. - P. 237-240.
- 26 Friedman R. A., Honig B. A free energy analysis of nucleic acid base stacking in aqueous solution // *Biophys. J.* - 1995. - Vol. 69. No. 4. - P. 1528-1535. doi:10.1016/S0006-3495(95)80023-8.
- 27 Garg A., Heinemann U. A novel form of RNA double helix based on G•U and C•A+ wobble base pairing // *RNA*. - 2018. - Vol. 24. - P. 209-218. doi: 10.1261/rna.064048.117
- 28 Kool E.T. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication // *Annu. Rev. Biophys. Biomol.Struct.* - 2001. - Vol. 30. - P. 1-22. doi: 10.1146/annurev.biophys.30.1.1
- 29 Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson-Crick base pairs and their 641 associated isostericity matrices // *Nucleic Acids Res.* - 2002. - Vol. 30. - P. 3497-3531. doi: 10.1093/nar/gkf481.
- 30 Dai X., Zhuang Z., Zhao P. Computational analysis of miRNA targets in plants: current status and challenges // *Brief. Bioinformatics*. - 2011. - Vol.12. - P. 115-121. doi:10.1093/bb/bbq065
- 31 Davis E., Caiment F., Tordoir X., Cavaillé J., Ferguson-Smith A., Cockett N. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus // *Curr. Biol.* - 2005. - Vol. 15. - P. 743-749. doi: 10.1016/j.cub.2005.02.060
- 32 Wang J., Li Z., Liu B., Chen G., Shao N., Ying X. Systematic study of cis696 antisense miRNAs in animal species reveals miR-3661 to target PPP2CA in human cells // *RNA*. - 2016a. - Vol. 22. - P. 87-95. doi: 10.1261/rna.052894.115.
- 33 Wang Y., Li L., Tang Sh., Liu J., Zhang H., Zhi H. Combined small RNA and degradome sequencing to identify miRNAs and their targets in response to drought in foxtail millet // *BMC Genomics* 17:57. - 2016b. doi: 10.1186/s12863-016-0364-7
- 34 Yurikova O.Y., Aisina D.E., Niyazova R.E., Atambayeva S.A., Labeit S., Ivashchenko A.T. The interactions of miRNA-5p and miRNA-3p with the mRNAs of *Ortologous Genes* // *Mol. Biol.* - 2019. - Vol. 53. no. 4. - P. 692-704. doi: 10.1134/S0026898419040189
- 35 Bari A., Orazova S., Ivashchenko A. miR156- and miR171-binding sites in the protein coding sequences of several plant genes // *Biomed Res. Int.* - 2013. - Vol. 1. No. 7. doi: 10.1155/2013/307145.
- 36 Bari A., Sagaidak I., Pinski I., Orazova S., Ivashchenko A. Binding of miR396 to mRNA of genes encoding growth regulating transcription factors of plants // *Russ. J. Plant Physiol.* - 2014. - Vol. 61. - P. 807-810. doi:10.1134/S1021443714050033
- 37 Kiezun A., Artzi S., Modai S., Volk N., Isakov O., Shomron N. miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer // *BMC Res Notes*. - 2012. - Vol. 5. - P. 92-97.
- 38 Perri M., Lucente M., Cannataro R., De Luca I.F., Gallelli L., Moro G. Variation in immune-related microRNAs profile in human milk amongst lactating women // *Microna*. - 2018. - Vol. 7. - P. 107 - 14. doi: 10.2174/2211536607666180206150503
- 39 Melnik B.C. Milk disrupts p53 and DNMT1, the guardians of the genome: Implications for acne vulgaris and prostate cancer // *Nutrition & Metabolism (London)*. - 2017. - Vol. 14. No. 55.
- 40 Melnik B. C., Kakulas F., Geddes D. T., Hartmann P. E., John S. M., Carrera-Bastos P., Schmitz G. Milk miRNAs: Simple nutrients or systemic functional regulators? // *Nutrition & Metabolism (London)*. - 2016. -Vol.13. No. 42.
- 41 Melnik B. C., Schmitz G. MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators // *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*. - 2017a. - Vol. 31. No. 4. - P. 427-442.
- 42 Van Herwijnen M.J.C, Driedonks T.A.P., Snoek B.L., Kroon A.M.T., Kleinjan M. Abundantly present miRNAs in milk-derived extracellular vesicles are conserved between mammals // *Front Nutr.* - 2018. - Vol. 5. No. 81. doi: 10.3389/fnut.2018.00081
- 43 Zempleni J., Baier S. R., Howard K. M., Cui J. Gene regulation by dietary microRNAs // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. - 2015b. - Vol. 93. No. 12. - P. 1097-1102.
- 44 Fromm B., Tosar J. P., Lu Y., Halushka M. K., Witwer K.W. Human and cow have identical miR-21-5p and miR-30a-5p sequences, which are likely unsuited to study dietary uptake from cow milk // *J. Nutr.* - 2018. -Vol. 148. - P. 1506 -7. doi: 10.1093/jn/nxy144.

- 45 Lujambio A., Calin G.A., Villanueva A., Ropero S., Sanchez-Cespedes M., Blanco D. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105. No. 13556–61. doi: 10.1073/pnas.0803055105
- 46 Takagi S., Nakajima M., Mohri T., Yokoi T. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4 // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. doi: 10.1074/jbc.M709382200
- 47 Chen X., Gao C., Li H., Huang L., Sun Q., Dong Y. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products // *Cell Res.* – 2010. -Vol. 20. – P. 1128–37. doi: 10.1038/cr.2010.80
- 48 Stittrich A.B., Haftmann C., Sgouroudis E., Kuhl A.A., Hegazy A.N., Panse I. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes // *Nat. Immunol.* – 2010. -Vol. 11. – P. 1057–62. doi: 10.1038/ni.1945
- 49 Gazieli-Sovran A., Segura M.F., Di Micco R., Collins M.K., Hanniford D., VegaSaenz De Miera E. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis // *Cancer Cell.* – 2011. – Vol. 20. – P. 104–18. doi: 10.1016/j.ccr.2011.05.027 43.
- 50 Xi Y., Formentini A., Chien M., Weir D. B., Russo J.J., Ju J. Prognostic values of microRNAs in colorectal cancer // *Biomark Insights.* – 2006. – Vol. 2. – P. 113–21. doi: 10.1177/117727190600100009 48.
- 51 O'hara A.J., Vahrson W., Dittmer D.P. Gene alteration and precursor and mature microRNA transcription changes contribute to the miRNA signature of primary effusion lymphoma // *Blood.* -2008. – Vol. 111. – P. 2347–53. doi: 10.1182/blood-2007-08-104463 49.
- 52 Elyakim E., Sitbon E., Faerman A., Tabak S., Montia E., Belanis L. hsamiR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy // *Cancer Res.* -2010. – Vol. 70. – P. 8077–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1313
- 53 Sheedy F.J., Palsson-Mcdermott E., Hennessy E.J., Martin C., O'leary J.J., Ruan Q. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21 // *Nat. Immunol.* – 2010. – Vol.11. – P.141–7. doi: 10.1038/ni.1828
- 54 Jennewein C., Von Knethen A., Schmid T., Brune B. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma. (PPARgamma) mRNA destabilization // *J. Biol. Chem.* -2010. -Vol. 285. -P.11846–53. doi: 10.1074/jbc.M109.066399.
- 55 Johnnidis J. B., Harris M.H., Wheeler R.T., Stehling-Sun S., Lam M.H., Kirak O. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223 // *Nature.* – 2008. – Vol. 451: – P. 1125–9. doi: 10.1038/nature06607
- 56 Haneklaus M., Gerlic M., O'neill L.A., Masters S.L. miR-223: infection, inflammation and cancer // *J. Intern. Med.* – 2013. 274:215–26. doi: 10.1111/joim.12099
- 57 Nahid M.A., Pauley K. M., Satoh M., Chan E.K. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: implication in innate immunity // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 34590–9. doi: 10.1074/jbc.M109.056317
- 58 Baier S.R., Nguyen C., Xie F., Wood J.R., Zemleni J. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK293 kidney cell cultures, and mouse livers // *J. Nutr.* – 2014. – Vol. 144. – P. 1495–500. doi: 10.3945/jn.114.196436
- 59 Shu J., Chiang K., Zemleni J., Cui J. Computational characterization of exogenous microRNAs that can be transferred into human circulation // *PLoS One.* – 2015. – Vol.10













## References

- 1 Andreas N.J., Kampmann B., Mehring Le-Doare K. (2015) Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, vol. 91, no.11, pp. 629–635.
- 2 Alsaweed M. Lai C.T., Hartmann P.E., Geddes D.T., Kakulas F. (2016) Human milk cells contain numerous miRNAs that may change with milk removal and regulate multiple physiological processes. *Intern. J. Molec. Sci.*, vol.17, no. 956. doi: 10.3390/ijms17060956
- 3 Ambros V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, vol. 431, no. 7006, pp. 350–355.
- 4 Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions, *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215–233.
- 5 Benmoussa A., Lee C. H., Laffont B., Savard P., Laugier J., Boilard E., Provost P. (2016) Commercial dairy cow milk microRNAs resist digestion under simulated gastrointestinal tract conditions, *Journal of Nutrition*, vol. 146, no. 11, pp. 2206–2215.
- 6 Bissels U., Bosio A., Wagner W. (2012) MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica*, vol. 97, no. 2, pp. 160–167.
- 7 Bari A., Orazova S., Ivashchenko A. (2013) miR156- and miR171-binding sites in the protein coding sequences of several plant genes. *Biomed Res. Int.*, vol. 1, no. 7. doi: 10.1155/2013/307145.
- 8 Bari A., Sagaidak I., Pinski I., Orazova S., Ivashchenko A. (2014) Binding of miR396 to mRNA of genes encoding growth regulating transcription factors of plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. 61, pp. 807–810. doi:10.1134/S1021443714050033
- 9 Baier S.R., Nguyen C., Xie F., Wood J.R., Zemleni J. (2014) MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J. Nutr.*, vol.144, pp. 1495–500. doi: 10.3945/jn.114.196436
- 10 Cui J., Zhou B., Ross S.A., Zemleni J. (2017). Nutrition, microRNAs, and Human Health. *Adv. Nutr.*, vol. 8, pp.105–112. doi: 10.3945/an.116.013839.

- 11 Chen X., Gao C., Li H., Huang L., Sun Q., Dong Y. (2010) Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res.* vol. 20, pp. 1128–37. doi: 10.1038/cr.2010.80
- 12 Dai X., Zhuang Z., Zhao P. (2011) Computational analysis of miRNA targets in plants: current status and challenges. *Brief. Bioinformatics* vol.12, pp.115-121.doi1093/bb/bbq065
- 13 Davis E., Caiment F., Tordo X., Cavaillé J., Ferguson-Smith A., Cockett N. (2005). RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted *Rtl1/Peg11* locus. *Curr. Biol.*, vol.15, pp. 743–749. doi: 10.1016/j.cub.2005.02.060
- 14 Elyakim E., Sitbon E., Faerman A., Tabak S., Montia E., Belanis L. (2010) has-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Res.* vol.70, pp.8077–87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1313
- 15 Feng Y., Li N., Ma H., Bei B., Han Y., Chen G. (2018). Undescribed phenylethyl flavones isolated from *patrinia villosa* show cytoprotective properties via the modulation of the mir-144-3p/nrf2 pathway. *Phytochemistry*, vol. 153, pp. 28–35.
- 16 Fromm B., Tosar J.P., Lu Y., Halushka M.K., Witwer K.W. (2018) Human and cow have identical miR-21–5p and miR-30a–5p sequences, which are likely unsuited to study dietary uptake from cow milk. *J. Nutr.* vol. 148, pp. 1506–7. doi: 10.1093/jn/nxy144.
- 17 Friedman R.A., Honig B. (1995) A free energy analysis of nucleic acid base stacking in aqueous solution. *Biophys. J.* vol. 69, no.4, pp. 1528–1535. doi:10.1016/S0006-3495(95)80023-8.
- 18 Garg A., Heinemann U. (2018) A novel form of RNA double helix based on G•U and C•A+ wobble base pairing. *RNA.* vol. 24, pp.209–218. doi: 10.1261/rna.064048.117
- 19 Gaziel-Sovran A., Segura M.F., Di Micco R., Collins M.K., Hanniford D., VegaSaenz De Miera E. (2011) miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell.* 20:104–18. doi: 10.1016/j.ccr.2011.05.027 43.
- 20 Haneklaus M., Gerlic M., O’neill L.A., Masters S.L. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J. Intern. Med.* (2013) 274:215–26. doi: 10.1111/joim.12099
- 21 Stittrich A.B., Haftmann C, Sgouroudis E, Kuhl A.A., Hegazy A.N., Panse I. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. (2010) *Nat. Immunol.* vol.11, pp.1057–62. doi: 10.1038/ni.1945
- 22 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. (2014) MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes. *Bioinformation.* vol. 10, pp.423–427. doi: 10.6026/97320630010423.
- 23 Ivashchenko A.T., Pyrkova A.Y., Niyazova R.Y., Alybayeva A., Baskakov K. (2016). Prediction of miRNA binding sites in mRNA. *Bioinformation* 12, pp.237–240.
- 24 Izumi H., Tsuda M., Sato Y., Kosaka N., Ochiya T., Iwamoto H., Takeda Y. (2015) Bovine milk exosomes contain miRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no. 5, pp. 2920–2933.
- 25 Jennewein C., Von Knethen A., Schmid T., Brune B. (2010) MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma. (PPARgamma) mRNA destabilization. *J. Biol. Chem.* vol.285, pp.11846–53. doi: 10.1074/jbc.M109.066399.
- 26 Johnnidis J.B., Harris M.H., Wheeler R.T., Stehling-Sun S., Lam M.H., Kirak O. (2008) Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* vol.451:pp. 1125–9. doi: 10.1038/nature06607
- 27 Kosaka N., Izumi H., Sekine K., Ochiya T. (2010) MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence.* vol.1, no.7, doi: 10.1186/1758-907X-1-7.
- 28 Kool E.T. (2001) Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* vol.30, pp.1–22. doi: 10.1146/annurev.biophys.30.1.1
- 29 Kiezun A., Artzi S., Modai S., Volk N., Isakov O., Shomron N. (2012) miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer. *BMC Res Notes.*, vol.5, pp.92–97.
- 30 Lujambio A., Calin G.A., Villanueva A., Ropero S., Sanchez-Cespedes M., Blanco D. (2008) A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol.105, no.13556–61. doi: 10.1073/pnas.0803055105
- 31 Li Z., Xu R., Li N. (2018) MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? *Nutr. Metab.* vol.15, no.68. doi: 10.1186/s12986-018-0311-x.
- 32 Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. (2002) The non-Watson-Crick base pairs and their 641 associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res.* vol.30, pp.3497–3531. doi: 10.1093/nar/gkf481.
- 33 Meister G. (2013) Argonaute proteins: Functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, vol.14, no.7, pp. 447–459.
- 34 Meza-Sosa K.F., Pedraza-Alva G., Perez-Martinez L. (2014) MicroRNAs: Key triggers of neuronal cell fate. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 8, no.175.
- 35 Melnik B.C. (2015a) Milk: An epigenetic amplifier of FTO-mediated transcription? Implications for western diseases. *Journal of Translational Medicine*, vol.13, no. 385.
- 36 Melnik B.C., Kakulas F., Geddes D.T., Hartmann P.E., John S.M., Carrera-Bastos P., Schmitz G. (2016) Milk miRNAs: Simple nutrients or systemic functional regulators? *Nutrition & Metabolism (London)*, vol.13, no. 42
- 37 Melnik B.C., John S.M., Carrera-Bastos P., Schmitz G. (2016a) Milk: A postnatal imprinting system stabilizing FOXP3 expression and regulatory T cell differentiation. *Clinical and Translational Allergy*, vol. 6, no.18. <https://doi.org/10.1186/s13601-016-0108-9>
- 38 Melnik B.C. (2017) Milk disrupts p53 and DNMT1, the guardians of the genome: Implications for acne vulgaris and prostate cancer. *Nutrition & Metabolism (London)*, vol.14, no. 55.

- 39 Melnik B.C., Schmitz G. (2017a) MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol.31, no.4, pp. 427–442.
- 40 Mysore R., Zhou Y., Sadevirta S., Savolainen-Peltonen H., Nidhina Haridas P. A., Soronen J., Olkkonen V. M. (2016). MicroRNA-192 impairs adipocyte triglyceride storage. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1861, no.4, pp. 342–351
- 41 Nahid M.A., Pauley K.M., Satoh M., Chan E.K. (2009) miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: implication in innate immunity. *J. Biol. Chem.* vol. 284, pp. 34590–9. doi: 10.1074/jbc.M109.056317
- 42 O'Connell R. M., Rao D.S., Chaudhuri A. A., Baltimore D. (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, vol.10, no.2, pp. 111–122
- 43 O'hara A.J., Vahrson W., Dittmer D.P. (2008) Gene alteration and precursor and mature microRNA transcription changes contribute to the miRNA signature of primary effusion lymphoma. *Blood*. vol. 111, pp. 2347–53. doi: 10.1182/blood-2007-08-104463
- 44 Provost P., Dishart D., Doucet J., Frendewey D., Samuelsson B., Radmark O. (2002) Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human dicer. *The EMBO Journal*, vol. 21, no.21, pp. 5864–5874.
- 45 Perri M., Lucente M., Cannataro R., De Luca I.F., Gallelli L., Moro G. (2018) Variation in immune-related microRNAs profile in human milk amongst lactating women. *Microna*. vol.7, pp.107 – 14. doi: 10.2174/2211536607666180206150503
- 46 Shu J., Chiang K., Zempleni J., Cui J. (2015) Computational characterization of exogenous microRNAs that can be transferred into human circulation. *PLoS One*. vol.10
- 47 Stittrich A.B., Haftmann C., Sgouroudis E., Kuhl A. A., Hegazy A. N., Panse I. (2010) The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nat. Immunol.* vol.11, pp.1057– 62. doi: 10.1038/ni.1945
- 48 Sheedy F.J., Palsson-Mcdermott E., Hennessy E.J., Martin C., O'leary J.J., Ruan Q. (2010) Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol*, vol.11, pp.141–7. doi: 10.1038/ni.1828
- 49 Takagi S., Nakajima M., Mohri T., Yokoi T. (2008) Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by microRNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.* vol. 283, doi: 10.1074/jbc.M709382200
- 50 Van Herwijnen M.J.C, Driedonks T.A.P., Snoek B.L., Kroon A.M.T., Kleijnan M. (2018) Abundantly present miRNAs in milk-derived extracellular vesicles are conserved between mammals. *Front Nutr*, vol.5, no.81. doi: 10.3389/fnut.2018.00081
- 51 Wang J., Li Z., Liu B., Chen G., Shao N., Ying X. (2016a) Systematic study of cis696 antisense miRNAs in animal species reveals miR-3661 to target PPP2CA in human cells. *RNA* vol.22, pp.87–95. doi: 10.1261/rna.052894.115.
- 52 Wang Y., Li L., Tang Sh., Liu J., Zhang H., Zhi H. (2016b). Combined small RNA and degradome sequencing to identify miRNAs and their targets in response to drought in foxtail millet. *BMC Genomics* 17:57. doi: 10.1186/s12863-016-0364-7
- 53 Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Wang K. (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, vol. 56, no. 11, pp. 1733–1741.
- 54 West S. (1999) Introducing the Scythians: Herodotus on koumiss. *Museum Helveticum*.vol.56, pp.76-86.
- 55 Xi Y., Formentini A., Chien M., Weir D. B., Russo J.J., Ju J. (2006) Prognostic values of microRNAs in colorectal cancer. *Biomark Insights*, vol. 2, pp.113–21. doi: 10.1177/117727190600100009 48.
- 56 Yurikova O.Y., Aisina D.E., Niyazova R.E., Atambayeva S.A., Labeit S., Ivashchenko A.T. (2019) The interactions of miRNA-5p and miRNA-3p with the mRNAs of Orthologous Genes *Mol. Biol.* vol.53, no.4, pp. 692-704. doi: 10.1134/S0026898419040189
- 57 Zempleni J., Kusuma R. J., Manca S., Friemel T., Sukreet S., Nguyen C. (2016) Human vascular endothelial cells transport foreign exosomes from cow's milk by endocytosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol.310, no.10, pp.800–807.
- 58 Zempleni J., Aguilar-Lozano A., Sadri M., Sukreet S., Manca S., Wu D., Mutai E. (2017) Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants. *Journal of Nutrition*, vol.147, no.1, pp. 3–10.
- 59 Zempleni J., Baier S.R., Howard K. M., Cui J. (2015b) Gene regulation by dietary microRNAs. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 93, no.12, pp.1097–1102.



К.Д. Жугунисов<sup>1</sup> , А.А. Керимбаев<sup>1</sup> , С.К. Копеев<sup>1</sup> ,  
Б.Ш. Мырзахметова<sup>1</sup> , М.С. Туысканова<sup>1,2\*</sup> , А.К. Наханов<sup>1</sup> ,  
Б.М. Хайруллин<sup>1</sup> , М.Б. Орынбаев<sup>1</sup> , Е.О. Абдураимов<sup>1</sup> ,  
М.М. Касенов<sup>1</sup> , К. Закарья<sup>1</sup> , Л.Б. Кутумбетов<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Научный Исследовательский Институт Проблем Биологической Безопасности,  
Казахстан пгт. Гвардейский

<sup>2</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы  
\*e-mail: monica\_94@list.ru

## ВИРУС SARS-COV-2: ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ, ИНАКТИВАЦИЯ И ПАССИРОВАНИЕ

Коронавирусы – это большое семейство РНК-содержащих вирусов, способных инфицировать человека и ряд видов животных. В настоящее время известно о циркуляции среди населения нескольких видов коронавирусов, которые, как правило, вызывают заболевания верхних дыхательных путей и легких со средней тяжестью. К этому списку прибавилась новая коронавирусная инфекция COVID-19 (SARS-CoV-2). Вирус быстро распространился во все страны мира. В последнее время в Казахстане данная инфекция наблюдается с ярко выраженной пневмонией среди населения.

Следует отметить, что при работе с живым вирусом мы столкнулись с некоторыми вопросами касающихся биологической и физико-химических свойств вируса, которые остались вне внимания ученых мира. В связи с этим, в этих исследованиях нами были изучены некоторые физико-химические и биологические свойства казахстанского штамма вируса SARS-CoV-2,

Проведены исследования по поиску дополнительных биологических моделей, чувствительных к вирусу SARS-CoV-2 и используемых *in vitro*. Установлено, наиболее чувствительными к вирусу SARS-CoV-2 были культуры клеток обезьян и свиней, в которых вирус активно репродуцировался.

Были изучены влияние условий хранения образцов нуклеиновых кислот вируса SARS-CoV-2, а также влияние условий окружающей среды к самому вирусу SARS-CoV-2. Результаты проведенных нами исследований показали, что процесс замораживания при температуре минус 70°C и размораживания при комнатной температуре (20-22°C) не оказывает заметного влияния на качественный характер цитопатогенности, но оказывает негативное влияние на сохранность титра вируса.

Данные о влиянии химических факторов при работе с возбудителями болезней необходимы для создания условий биологической безопасности для персонала и окружающей среды. В данном исследовании нами изучено влияние формальдегида к вирусу. Полученные результаты показывают, что инактивация вируса Sars-CoV-2 с помощью формалина зависит от концентрации формальдегида, температуры реакции, времени инкубации.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, культуры клеток, выделение, культивирование, термостабильность, инактивация, пассирование.

K. Zhugunisov<sup>1</sup>, A. Kerimbayev<sup>1</sup>, S. Kopeev<sup>1</sup>, B. Myrzakhmetova<sup>1</sup>,  
M. Tuyskanova<sup>1,2\*</sup>, A. Nakhanov<sup>1</sup>, B. Khairullin<sup>1</sup>, M. Orynbayev<sup>1</sup>,  
Ye. Abduraimov<sup>1</sup>, M. Kassenov<sup>1</sup>, K. Zakarya<sup>1</sup>, L. Kutumbetov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Biological Safety Problems, Kazakhstan, Gvardeisky township

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: monica\_94@list.ru

### SARS-CoV-2 virus: isolation, growth, thermostability, inactivation and passages

Coronaviruses are a large family of RNA-containing viruses capable of infecting humans and a number of animal species. At present, several types of coronaviruses are known to circulate among the population, causing diseases of the upper respiratory tract and lungs of moderate severity. The COVID-19 dis-

ease has been added to this list. The virus has spread rapidly around the world. Recently in Kazakhstan, this infection has been observed with pronounced pneumonia among the population.

It should be noted that when working with a live virus, we encountered some questions regarding the biological and physico-chemical properties of the virus, which remained outside the attention of world scientists. In this regard, in these studies, we studied some of the physicochemical and biological properties of the Kazakh strain of the SARS-CoV-2 virus.

Studies were conducted to find additional biological models sensitive to the SARS-CoV-2 virus and used in vitro. Of the 11 cell culture species tested, monkey and pig cells were found to be the most sensitive to the SARS-CoV-2 virus, in which the virus was actively reproducing.

We studied the effect of storage conditions of SARS-CoV-2 nucleic acid samples as well as the effect of environmental conditions on the SARS-CoV-2 virus itself. The results of our studies showed that freezing at minus 70 °C and thawing at room temperature (20-22 °C) had no appreciable effect on the qualitative character of cytopathogenicity but had a negative effect on the preservation of virus titer.

Data on the influence of chemical factors when working with pathogens are necessary to create conditions for biological safety for personnel and the environment. In this study, we studied the effect of formaldehyde on the virus. The results obtained show that the inactivation of the Sars-CoV-2 virus by formalin depends on its concentration, reaction temperature, and incubation time.

**Key words:** SARS-CoV-2, cell culture, isolation, growth, thermostability, inactivation, passages.

Қ.Д. Жүгінісов<sup>1</sup>, А.А. Керімбаев<sup>1</sup>, С.К. Көпеев<sup>1</sup>, Б.Ш. Мырзахметова<sup>1</sup>,  
М.С. Туысқанова<sup>1,2\*</sup>, А.К. Наханов<sup>1</sup>, Б.М. Хайруллин<sup>1</sup>, М.Б. Орынбаев<sup>1</sup>,  
Е.О. Абдураимов<sup>1</sup>, М.М. Қасенов<sup>1</sup>, К. Закарья<sup>1</sup>, Л.Б. Құтұмбетов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты, Қазақстан пгт.Гвардейский

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: monica\_94@list.ru

### **SARS-CoV-2 вирусын оқшаулау, өсіру, термотұрақтылығы, инактивтендіру және пассаждау**

Коронавирустар – адам мен жануарларда бірқатар ауру түрлерін тудыратын РНҚ-лы вирустардың үлкен тобы. Қазіргі уақытта адамдар популяциясында белгілі коронавирустың бірнеше түрі белгілі, олар, әдетте, жоғарғы тыныс жолдарының және орташа ауырлықтағы өкпе ауруларын тудырады. Бұл тізімге жаңа COVID-19 коронавирустық инфекциясы қосылды (SARS-CoV-2). Вирус әлемнің барлық елдеріне тез таралды. Соңғы уақытта Қазақстанда бұл инфекция халық арасында айқын пневмониямен байқалады.

Айта кету керек, тірі вируспен жұмыс жасау кезінде біз әлем ғалымдарының назарынан тыс қалған вирустың биологиялық және физика-химиялық қасиеттеріне қатысты кейбір мәселелерге тап болдық. Осыған байланысты, осы зерттеулерде біз COVID-19 жаңа коронавирустық инфекциясымен ауырған науқас пациенттен оқшауланған SARS-CoV-2 вирусының қазақстандық штаммының кейбір физикалық-химиялық және биологиялық қасиеттерін, мысалы.

SARS-CoV-2 вирусына сезімтал және in vitro жағдайында қолдануға болатын қосымша биологиялық модельдерді іздеу бойынша зерттеулер жүргізілді. Тексерілген 11 жасуша дақылдарының ішінен SARS-CoV-2 вирусына ең сезімтал маймылдар мен шошқалардың жасуша культураларында екендігі анықталды, онда вирус белсенді түрде көбейтілді.

SARS-CoV-2 вирусының нуклеин қышқылдарының үлгілерін сақтау жағдайларының әсері, сондай-ақ SARS-CoV-2 вирусының қоршаған орта жағдайларының әсері зерттелді. Біз жүргізген зерттеулердің нәтижелері минус 70 °C температурада мұздату және бөлме температурасында еріту процесі (20-22 °C) цитопатогенділіктің сапалық сипатына айтарлықтай әсер етпейтінін, бірақ вирус титрінің сақталуына теріс әсер ететінін көрсетті.

Ауру қоздырғыштарымен жұмыс істеу кезінде химиялық факторлардың әсері туралы деректер персонал мен қоршаған орта үшін биологиялық қауіпсіздік жағдайларын жасау, сондай-ақ диагностикалық және профилактикалық мақсаттағы биологиялық препараттарды дайындау технологияларын жобалау үшін қажет. Бұл зерттеуде біз формальдегидтің вирусқа әсерін зерттедік. Нәтижелер SARS-CoV-2 вирусын формалинмен инактивациялау формальдегид концентрациясына, реакция температурасына, инкубация уақытына байланысты екенін көрсетеді.

**Түйін сөздер:** SARS-CoV-2, жасуша культуралары, оқшаулау, өсіру, термотұрақтылығы, инактивтендіру, пассаждау

## Сокращения и обозначения

WHO – Всемирная организация здравоохранения;

ATCC – Американская коллекция типовых культур (Манассас, штат Виргиния, США);

НИИПББ – Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (Гвардейский, Казахстан);

DMEM – Модифицированная среда Дюльбекко;

КРС – крупный рогатый скот;

ЦПД – цитопатическое действие;

ФБР – фосфатно буферный раствор

## Введение

Коронавирусы – это большое семейство РНК-содержащих вирусов, способных инфицировать человека и ряд видов животных [1-3]. У людей коронавирусы могут вызвать целый ряд заболеваний – от легких форм острой респираторной инфекции до тяжелого острого респираторного синдрома [3, 4]. В настоящее время известно о циркуляции среди населения следующих коронавирусов: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-NKUI, SARS-CoV, MERS-CoV, которые, как правило, вызывают заболевания верхних дыхательных путей и легких со средней тяжестью [5, 6]. К этому списку прибавилась новая коронавирусная инфекция COVID-19 (SARS-CoV-2), которая была зарегистрирована в КНР в конце декабря 2019 года в Ухане. Вирус быстро распространился во все страны мира [7], и 13 марта 2020 года была впервые зарегистрирована на территории Республики Казахстан [8]. В последнее время в Казахстане данная инфекция наблюдается с ярко выраженной пневмонией среди населения (неопубликованные данные).

После появления высоко патогенного для человека нового коронавируса SARS-CoV-2 учеными мира были получены данные о его происхождении [9-11], распространении [12], эволюции [13, 14], генетики [15, 16, 17, 18], биологических [19], физико-химических [20] и патогенных свойствах [21, 22], а также о патогенезе [23], методы диагностики и лечения вызываемой им заболеванием [24]. Многие исследования, проводимые в странах мира, были направлены на разработку собственных вакцин для быстрого реагирования и ликвидации данной инфекции с последующим изучением их безопасности и иммуногенности на животных и людях. Казахстан также прису-

пил к разработке отечественных вакцин против новой коронавирусной инфекции, из которых 2 вакцины находятся на **II и III стадии клинических испытаний**, еще две проходят доклинические испытания (данные неопубликованы). При разработке вакцины нами пришлось работать с живым вирусом SARS-CoV-2, который был выделен от больного пациента, заболевшего новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Работа с новым вирусом коронавирусной инфекции требуют строгого соблюдения биологической безопасности, опыта и новых знаний биологической особенности вируса SARS-CoV-2. Следует отметить, что при работе с живым вирусом мы столкнулись с некоторыми вопросами касающихся биологической и физико-химических свойств вируса, которые остались вне внимания ученых мира. В связи с этим, в этих исследованиях нами были изучены некоторые физико-химические и биологические свойства казахстанского штамма вируса SARS-CoV-2, выделенного от больного пациента, заболевшего новой коронавирусной инфекцией COVID-19, такие как термостабильность (сохраняемость), инаktivация вируса различными концентрациями формальдегида при различных температурно-временных режимах и пассирование вируса в культуре клеток.

## Материалы и методы

*Клинические образцы.* В данной работе нами были использованы назофарингеальные смывы (мазки), полученные от 6 больных пациентов с диагнозом «**SARS-CoV-2**», **получающих терапию** в городской инфекционной клинической больнице имени И. Жекеновой г. Алматы. Эти пробы были взяты медицинскими сотрудниками городской инфекционной больницы и переданы в лабораторию НИИПББ, соблюдая международные и отечественные требования при транспортировке клинических образцов [25, 26, 27]. Эти образцы использовали в качестве источника возбудителя коронавирусной инфекции для заражения культуры клеток с последующим выделением данного вируса.

*Культуры клеток и питательная среда.* В данной работе мы использовали перевиваемые и первичные линии культуры клеток, различного происхождения представленные в таблице 1, которые выращивали в соответствующих питательных средах, содержащих 10 % фетальной сыворотки КРС и 200 мкг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл пенициллина и 400 мкг/мл гентамицина.

**Таблица 1** – Клеточные линии приматов и других животных, использованные в исследовании

Название и происхождение клеточной линии	Аббревиатура	Источник клеточной линии	Среда для клеточной линии
Клетки приматов			
Почка африканской зеленой мартышки	Vero	WHO	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Почка эмбриона макаки-резус	Ma-104	ATCC	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Почка эмбриона макаки-резус (клон Ma-104)	MARC-145	ATCC	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки кошек			
Почка кошки	CRFK	ATCC CCL-94	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки собаки			
Почка щенка	PK	Внутренняя разработка (НИИПББ)	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Почка собаки Мадин-Дарби	MDCK	ВОЗ	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки свиньи			
Почка свиньи	PK-15	Разработана в НИИПББ	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Эмбриональная линия привитых эпителиальных клеток почки свиньи	SPEV	Московский НИИ вирусных препаратов (РФ)	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки хомяка			
Фибробласт почки хомячка	ВНК21	ATCC CCL-10	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки кролика			
Почка кролика	RK-13	ATCC CCL-37	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Клетки овцы			
Почка ягненка	LK	Разработана в НИИПББ	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)

WHO = Всемирная организация здравоохранения.

ATCC = Американская коллекция типовых культур (Манассас, штат Виргиния, США).

НИИПББ = Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (Гвардейский, Казахстан)

DMEM = Модифицированная среда Дюльбекко

*Выделение вируса в культуре клеток.* На монослой культуры клеток Vero, после удаления питательной среды, наносили кровь и суспензию смывов слизистой оболочки носовой полости больных в объеме 0,5 мл и выдерживали в течение 60 минут при температуре 37 °С. Затем инокулят удаляли, монослой промывали в трех сменах раствором PBS, вносили поддерживающую среду DMEM с фетальной сывороткой крови и продолжали культивирование при температуре 37 °С с ежедневной микроскопией монослоя культуры клеток. Наличие вируса устанавливали по цитопатогенному действию в зараженных культурах клеток сравнительно с контрольной незараженной культурой клеток. В случае отсутствия ЦПД в культуре клеток Vero, зараженной

образцами биоматериалов, проводили «слепое» пассирование в течение не менее трех генераций.

*Культивирование вируса в различных культурах клеток.*

Для изучения чувствительности различных культур клеток к вирусу SARS-CoV-2 использовали первичные и перевиваемые линии клеток, которые представлены в таблице 1. Перед заражением удаляли питательные среды из культуральных сосудов и вносили вирус со множественностью заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл в объеме по 0,5 мл на каждый сосуд и инкубировали при 37,0±0,5 °С в течение 1 ч для адсорбции вируса. После адсорбции суспензию удаляли, вносили поддерживающую среду, содержащую 2 % фетальной сыворотки КРС, и инкубировали



при  $37,0 \pm 0,5$  °С в течение 5 сут или до наступления 90-100 % ЦПД вируса. Состояние монослоя клеток для определения ЦПД вируса оценивали при просмотре культуральных сосудов под инвертированным микроскопом Olympus СКХ31 («Olympus Co.», Япония). При последующем пассаже культуры клеток инфицировали размороженной вирусосодержащей суспензией в объеме 0,5 мл на каждый сосуд. О перmissивности культур клеток судили по наличию цитопатических изменений в монослое и изменению титра вируса в процессе пассирования. Инфекционную активность вируса определяли титрованием в 1-2-суточной клеточной линии VERO, выращенной в 96-луночных микропланшетах.

#### *Адаптация вируса к культуре клеток*

При адаптации вируса к культуре клеток Vero применяли метод серийного пассирования. Культуру клеток Vero выращивали в среде DMEM с 10 % фетальной сыворотки КРС. При образовании сплошного монослоя (через 24 ч) из культуральных сосудов удаляли ростовую среду и вносили вирус со множественностью заражения 0,1, 0,01 0,001 ТЦД50/кл в зависимости от пассажа вируса в культуре клеток. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при  $37,0 \pm 0,5$  °С. После этого вносили поддерживающую среду, содержащую 2 % фетальной сыворотки КРС. Инфицированную культуру клеток инкубировали при  $37,0 \pm 0,5$  °С в течение 5 сут или до наступления 90-100 % ЦПД вируса. Затем культуру клеток и культуральную жидкость замораживали при  $-50,0 \pm 0,5$  °С. При следующем пассаже, культуры клеток инфицировали размороженной вирусосодержащей суспензией. Инфекционную активность вируса определяли титрованием в 1-2-суточной культуре клеток VERO, выращенной в 96-луночных микропланшетах. Титр вируса рассчитывали по методу Reed–Muench и выражали в lg ТЦД50/см<sup>3</sup> (24).

#### *Сохраняемость вируса Sars-Cov-2 после трехкратного замораживания и оттаивания.*

Исходный материал вируса Sars-Cov-2 с титром  $5,66 \pm 0,28$  lg ТЦД50/мл аликвотировали по 1 мл в 9 плотно закрытые 1,5-мл микроцентрифужные пробирки и замораживали при  $-70$  °С в течение 24 ч. По истечении этого времени, размораживали при комнатной температуре до полного оттаивания (однократное замораживание и оттаивание). После чего 3 пробирки с вирусом титровали в культуре клеток Vero по отдельности, для определения инфекционной активности. Оставшиеся 6 пробирок повторно замораживали

при температуре  $-70$  °С в течение 24 ч (двукратное замораживание и оттаивание). На следующий день оставшиеся 6 пробирок с вирусом размораживали при комнатной температуре. После полного оттаивания, 3 пробирки титровали в культуре клеток, оставшиеся 3 пробирки с вирусом вновь замораживали при  $-70$  °С до следующего дня, с последующим титрованием вируса на культуре клеток Vero (трехкратное замораживание и оттаивание).

#### *Обработка формальдегидом*

Инактивацию вируса формальдегидом проводили в закрытых стеклянных колбах. При этом, в опыте были использованы вирус с титром  $6,25 \pm 0,22$  lg ТЦД50/мл. Перед инактивацией вируса готовили 3 % рабочий водный раствор формальдегида из 37% водного раствора формальдегида. К вирусной суспензии добавляли 3 % рабочий раствор формальдегида до концентрации 0,05 % и 0,1 %. Далее вирусную суспензию инкубировали при температурах (4-8) °С, (20-22) °С и ( $37 \pm 0,5$ ) °С. Колбы с реакционной смесью постоянно перемешивали с помощью магнитной мешалки со скоростью вращения 60-80 об/мин. Каждый час отбирали пробы, прекращали действие инактиванта добавлением 25% раствора бисульфит натрия в концентрации пропорциональной по молекулярной массе формальдегиду, добавленному в биомассу и помещали в холодильник при температуре 4-60 С. Инфекционная активность вируса определялась по общепринятой методике с учётом результатов титрования по методу Reed–Muench [28] и выражением в lg ТЦД50/мл.

Титрование вируса. Инфекционную активность вируса определяли методом титрований согласно методике Reed–Muench [28] в культуре клеток Vero, выращенной в 96-луночном культуральном микропланшете. Вкратце, последовательные 10-кратные разведения исходного материала вируса от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup> готовили в среде DMEM с добавлением 2% ФБР, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и 100 мкл разведенного вируса добавляли в каждую лунку. Клетки инкубировали при 37° С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 7 дней, и наличие цитопатического эффекта оценивали с использованием инвертированного микроскопа. Титр вируса рассчитывали по формуле Reed–Muench, выражали в lg ТЦД50/мл.

Выделение РНК. РНК была извлечена из клинических образцов, а также из культуральных пассажных материалов (1 и 2 пассажа) с

помощью QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN, Хильден, Германия) согласно инструкции производителя.

RT-ПЦР в реальном времени. Для амплификации N гена вируса SARS-CoV-2 были использованы следующие праймеры и зонд: N\_Sarbeco\_F (cacattggcaccgcgaatc), N\_Sarbeco\_R (gaggaacgagaagaggcttg) и N\_Sarbeco\_P (fam-acttctctcaaggaacaattggcca-bbq) [29]. Вирусный геном оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием набора Superscript® III Platinum One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase системы (Invitrogen, США) согласно инструкции изготовителя. Реакции проводили в термоциклере Rotor-Gene 6000 Series (Qiagen, Германия) по следующей программе: 1 цикл обратной транскрипции при 50°C в течение 20 мин, 1 цикл 95°C в течение 3 мин, затем 45 циклов 95°C в течение 15 с, 58°C в течение 30 с.

#### Статистический анализ

Статистический анализ результатов исследований проводили с использованием программы GraphPadPrism 6. Для всех данных была применена описательная статистика: подсчитаны средние значения (M), стандартное отклонение (SD) и стандартные ошибки

среднего (SEM). Мы сравнили репликацию вируса SARS-CoV-2 в различных клеточных линиях с односторонним дисперсионным анализом ANOVA.

## Результаты

### Выделение и идентификация вируса

Клинические образцы (мазки) собранные от шести пациентов были исследованы в ПЦР на наличие РНК вируса SARS-CoV-2 (табл. 2). Только в одном образце (назальный мазок) у пациента №1 был обнаружен вирусный геном (значение Ct 25.4) на уровне положительного контроля (значение Ct 24.1). Во всех остальных клинических образцах обнаружены низкие уровни вирусного генома. Диапазон значений Ct остальных пациентов в крови было в пределах 34.1–40.1, а в мазках составляло 35.9–40.7 (результаты не показаны).

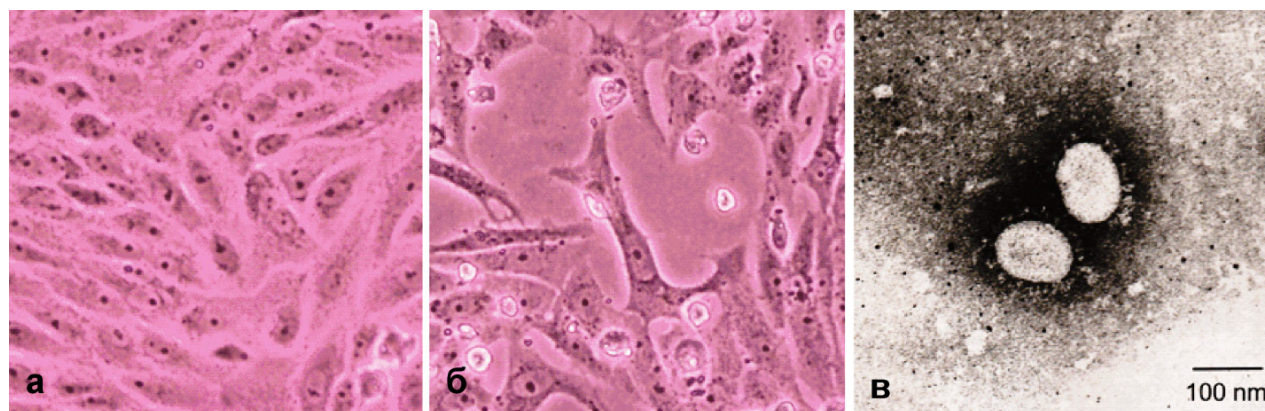
После заражения клиническими образцами культуры клеток был выделен вирус на первом пассаже только из назального мазка пациента №1. В других биологических образцах наличие цитопатогенного агента не удалось выявить в течение 3-х последовательных пассажей (результаты не показаны).

Таблица 2 – Результаты ПЦР-исследований и выделения вируса в культуре клеток

Пациент	Исходная проба		Номера пассажей									
	Титр вируса, ТЦД <sub>50/мл</sub>	Ct значение	1		2		3		4		5	
			Титр вируса, ТЦД <sub>50/мл</sub>	Ct значение	Титр вируса, ТЦД <sub>50/мл</sub>	Ct значение	Титр вируса, ТЦД <sub>50/мл</sub>	Ct значение	Титр вируса, ТЦД <sub>50/мл</sub>	Ct значение	Титр вируса, ТЦД <sub>50/мл</sub>	Ct значение
№ 1	1,66 ± 0.28	25,4	2,75 ± 0.25	17.3	4,58 ± 0.14	15.4	5,41 ± 0.28	13.3	5,66 ± 0.28	13.1	6,08 ± 0.38	13.2

На первом пассажном уровне цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero проявлялось, начиная с третьего дня после заражения. Со временем количество округляющихся и десквамируемых клеток увеличивается (рис.1б), на поверхности адгезии (в монослое культуры клеток) уменьшается количество расплывшихся клеток, формируются очаги пустоты, вследствие открепившихся кле-

ток (рис.1в) и увеличение межклеточного пространства при сравнении с контрольной культурой (рис.1а). Полная деструкция монослоя посредством отслоения/десквамации пораженных клеток наступала в течение 48-72 часов после появления признаков цитопатологии. Наличие вируса SARS-CoV-2 дополнительно было подтверждено методом электронной микроскопии (рис. 1в).

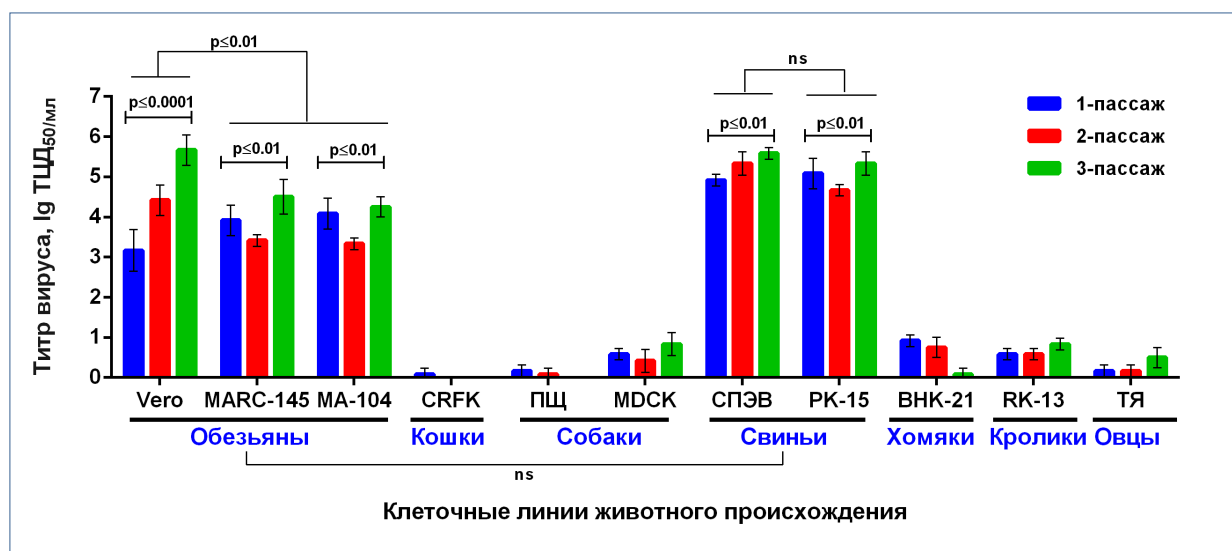


**Рисунок 1** а – неинфицированные клетки Vero, б –клетки Vero, зараженные вирусом SARS-CoV-2, на 3 день после заражения вирусом, в – электронная микрофотография вируса SARS-CoV-2.

*Чувствительность различных клеточных линий к вирусу*

В исследованиях были использованы 11 различных клеточных линий первичного и перевиваемого происхождения (таблица 1). В результате исследований установлено, что из 11 испытанных культур клеток наиболее чувствительными к вирусу SARS-CoV-2 оказались культуры клеток Vero, MARC-145, MA-104, СПЭВ, РК-15. ЦПД вируса проявлялось в этих клетках

через 24-48 ч и на 3-5 сут оно развивалось по всему монослою, поражая до 70-80 % клеток. Титр вируса в этих культурах клеток колебался в пределах 3,16-5,66 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> (рис. 2). Адаптация вируса в культуре клеток Vero происходила более быстро, нежели в других чувствительных клеточных линиях. Культуры клеток МДСК, РК-13, ТЯ, ПЩ, ВНК-21, CRFK оказались менее или полностью не чувствительными к испытываемому вирусу.



**Рисунок 2** – Чувствительность различных культур клеток к вирусу SARS-CoV-2. Для первичного заражения испытуемых культур клеток (MARC-145, Ma-104, CRFK, РК, МДСК, SPEV, РК-15, ВНК-21, РК-13, LT) был использован вирус Sars-cov-2 с титром 5,66±0.28 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а для Vero использован назофарингеальный мазок с титром 1,66±0.28 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Одиннадцать клеточных линий из различных тканей или органов обезьяньего, свиного, собачьего, кошачьего, хомячьего, кроличьего и овечьего происхождения заражали вирусом SARS-CoV-2 при 0,1 ТЦД<sub>50</sub>. Титры вирусных суспензии, наработанных в различных культурах клеток определены в культуре клеток Vero методом титрования на культуральных планшетах. Титр вируса показан в средних значениях со стандартным отклонением ±SD. Статистическая значимость рассчитывалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA

*Последовательное пассирование вируса Sars-Cov-2 в клетках Vero*

Клеточная линия Vero оказалась наиболее восприимчивой к инфекции вируса Sars-Cov-2 среди протестированных типов клеток позвоночных. Вирус Sars-Cov-2 был успешно пассирован путем переноса вирусной суспензии в течение 100 пассажей при температуре

инкубации 37 °С. При этом было установлено, что происходит адаптация вируса после каждого слепого пассажа в клетках Vero, сокращая начало срока цитопатического действия и срока культивирования. К тому же несмотря на уменьшение дозы заражения, титр вируса увеличивался с каждым пассажем (таблица 3).

**Таблица 3** – Результаты адаптации вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток методом последовательных пассажей

Пассаж	Доза заражения, ТЦД <sub>50/мл</sub>	Начало срока проявления ЦПД, ч	Срок культивирования, ч	Инфекционный титр вируса, lg10 ТЦД <sub>50/мл</sub>
1-5	0.1	72-96	165±5	4.66±0.28
5-10	0.1	72-96	148±5	6.61±0.23
10-20	0.01	72±5	120±5	6.75±0.21
20-30	0.01	48±2	72±5	6.75±0.21
30-40	0.001	36±3	48±3	7.25±0.18
40-50	0.001	24±3	36±2	7.00±0.10
50-100	0.001	24±3	36±2	7.25±0.18

*Сохраняемость вируса Sars-Cov-2 после 1-, 2- и 3 кратных замораживаний при температуре минус 70 °С и оттаивания при комнатной температуре (20-22 °С)*

Результаты проведенных исследований показали (таблица 4), что процесс замораживания при температуре минус 70°С и размораживания при комнатной температуре (20-22 °С) не оказы-

вает заметного влияния на качественный характер цитопатогенности вируса. Проявление ЦПД вируса в монослое клеток отмечался на 30-48 ч. Однако данный физический фактор оказывает существенное негативное влияние на сохранность инфекционного титра вируса. При этом инфекционный титр вируса в культуральной суспензии снизился от 0,50 до 0,92 lgТЦД<sub>50</sub>.

**Таблица 4** – Сохраняемость вируса после воздействия физических факторов

	0*	1*	2**	3***
Инфекционный титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	5,66±0.28	5,16±0.23	4,91±0.18	4,74±0.11
Проявление ЦПД вируса в монослое, час	30-48	30-48	30-48	30-48
Потеря инфекционного титра вируса	-	0.5	0.75 (0.25)	0.92 (0.17)
Примечания: 0* – исходный титр вируса до замораживания 1* – титр вируса после однократного замораживания при минус 70°С и размораживания при комнатной температуре (20-22 °С) 2** – титр вируса после двукратного замораживания при минус 70°С и размораживания при комнатной температуре (20-22 °С) 3*** – титр вируса после трехкратного замораживания при минус 70°С и размораживания при комнатной температуре (20-22 °С)				

*Инактивация вируса формальдегидом*

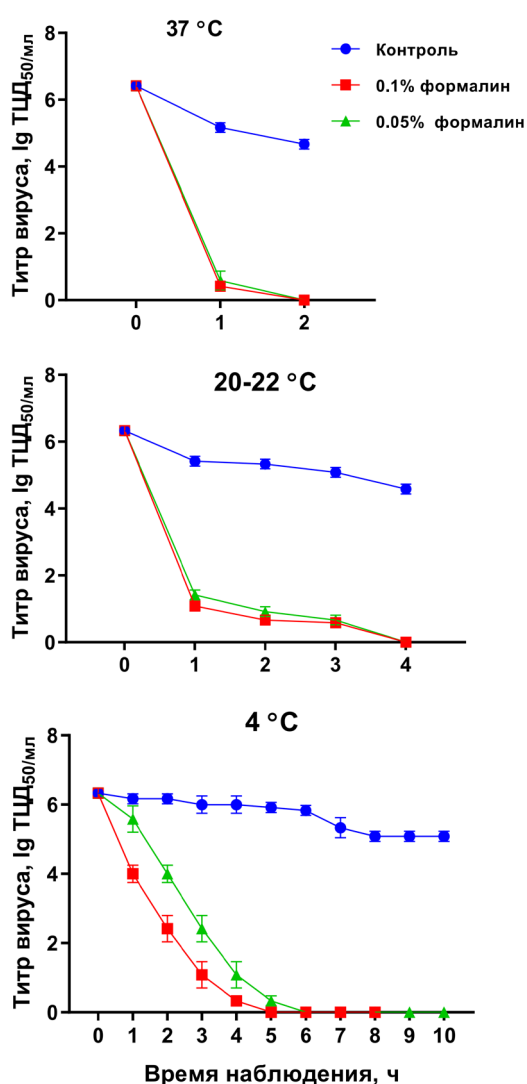
Скорость инактивации вируса Sars-Cov-2 под воздействием формальдегида в испытан-

ных концентрациях при различных температурах демонстрируется на рисунке. При конечных концентрациях формальдегида 0,05 и 0,1% при



температуре 37°C вирус теряет инфекционность для культур клеток через 2 часа. При комнатной температуре испытуемых концентраций формальдегида вирус теряет инфекционность для культуры клеток через 4 часа. При температуре 4°C инактивация вируса формальдегидом происходит значительно медленнее, чем при температурах 22°C и 37°C.

Так, обработка 0,1% и 0,05% растворами формалина при 4°C в течение 5 и 6 часа, соответственно ведет к полной потере его инфекционности для культуры клеток, а остаточную инерционность вируса для культуры клеток полностью утратил на 8 и 10 сутки, соответственно.



**Рисунок 3** – Сроки и кинетики инактивации вирусосодержащей суспензии штамма Sars-Cov-2 растворами формалина (в) при температуре 4 °C, 22 °C и 37 °C

## Обсуждение

За последних 10 лет вирусология сосредоточилась на изучении молекулярно-генетических свойств возбудителей вирусных инфекций, тогда как изучение физико-химических и биологических свойств вирусов остались вне внимания. Так, несмотря на проведенные исследования, касающиеся биологических и физико-химических свойств, многие основные вирусологические вопросы SARS-CoV-2 остаются без ответа. В данном исследовании мы выделили вирус Sars-Cov2, который в последующем был идентифицирован в ПЦР, секвенирован по N генам, изучена морфология с помощью электронной микроскопии. Цитопатологические действия вируса [30], морфология вириона [31] и нуклеотидная последовательность по N генам [32] ранее проведенные другими исследователями соответствуют выше приведенным нашим исследованиям.

Проведены исследования по поиску дополнительных биологических моделей, чувствительных к вирусу SARS-CoV-2 и используемых *in vitro*. Наличие таких моделей, кроме человеческого и обезьяньего происхождения, даст возможность подобрать биологическую модель, используемую для репродукции вируса и воспроизведения болезни *in vivo*. В связи с этим в данных исследованиях нами были проанализированы и в качестве таких объектов использовались биологические системы, имеющиеся в коллекции банка культур клеток НИИПББ, к которым относятся линии перевиваемых клеток ВНК-21, MARC-145, MA-104, Vero, СПЭВ, РК-15, РК-13 ПЩ, MDCK, и первичной культуры клеток ТЯ – тестикулы ягнят. Установлено, что из 11 испытанных видов культур клеток наиболее чувствительными к вирусу SARS-CoV-2 были культуры клеток обезьян (MA-104, MARC-145, Vero-WHO) и свиней (РК-15, СПЭВ), в которых вирус активно репродуцировался с увеличением биологической активности в последовательных пассажах. Культуры клеток MDCK, РК-13, ТЯ, CRFK, ВНК-21, ПЩ были не чувствительны к вирусу SARS-CoV-2. Полученные нами данные за исключением некоторой части, подтверждают результаты исследований, полученные в КНР [33]. Разницу в результатах составляют данные о чувствительности клеток кошачьего (CRFK), и кроличьего (РК-13) происхождения. В наших исследованиях эти линии клеток не обладали чувствительностью к вирусу, тогда как китайские исследователи утверждают об обратном

[33]. Следует отметить, что китайские ученые оценивали репликацию вируса в культурах клеток выявлением генома вируса с помощью ПЦР и жизнеспособности культуры клеток с помощью CellTiterGlo (Promega, Мэдисон, Висконсин, США), без учета развития ЦПД, которые, по нашему мнению, не полностью подтверждает чувствительность этих культур клеток к вирусу. Кроме того, в доступных литературах приведены результаты чувствительности клетки человеческого происхождения, а также в клетках летучих мышей по отношению вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 с целью установления хозяина происхождения.

Поиск информации в доступных открытых источниках показал об отсутствии данных по получению аттенуированного вируса путем серийного пассирования в культуре клеток, за исключением изучения иммуногенности и безопасности аттенуированного штамма, полученного методом селекции негативных бляшек [34]. Так, группа исследователей получила аттенуированный вариант вируса SARS-CoV-2, называемый Del-mut, который содержит делецию в соединении S1/S2. Полученный ими аттенуированный мутантный вариант вызывал легкую форму заболевания у хомяков не снижающий вес животного, демонстрируя более низкие уровни репликации вируса в легких, и являлся стабильным при длительном пассировании в клетках Vero-E6. Однако, отсутствуют данные до какого пассажа аттенуированный вирус был стабильным. В случае доступности этих данных многое можно было бы распознать касательно генотипических признаков аттенуированного или исходного вируса, проводя сравнительный анализ с нашими результатами. Тем не менее, мы хотели обратить особое внимание на фенотипические признаки вируса при заражении культуры клеток Vero. Так, нами выделенный вирус до 10 пассажа не вызывал гибель зараженных клеток, но зараженные клетки отслаивались от стекла культуральных сосудов теряя свои адгезивные свойства. После 10 пассажа вирус постепенно адаптировался к культуре клеток, сокращая сроки культивирования до 48 ч. и вызывая гибель клеток до 40-50 %. Ближе к 30 пассажу вирус полностью адаптировался к культуре и вызывал гибель 80-90% клеток, сокращая срок культивирования до 36 ч. С точки зрения медицины, данный факт возможно даст понять, в основном при изучении патогенеза вируса в организмах человека или

для правильного подбора противовирусных препаратов при лечении данной инфекции.

В исследовательской работе определенное значение имеет устойчивость возбудителя болезни к разным манипуляциям, в процессе которой он подвергается воздействию различных физико-химических факторов. Влияние условий хранения образцов нуклеиновых кислот вируса SARS-CoV-2 [35, 36], а также влияние условий окружающей среды (температура, относительная и абсолютная влажность, солнечный свет) к самому вирусу SARS-CoV-2 приведены в обзорном виде [37]. Исходя из такой ситуации, нами изучалось влияние замораживания и размораживания на сохранность вируса в репродуктивном состоянии. Paggiaro и др. [38], анализируя результаты других исследователей в своем литературном обзоре предполагают, что замораживание и оттаивание не влияет на инфекционный титр коронавируса. Однако, результаты проведенных нами исследований показали, что процесс замораживания при температуре минус 70°C и размораживания при комнатной температуре (20-22 °C) не оказывает заметного влияния на качественный характер цитопатогенности, но оказывает существенное негативное влияние на сохранность титра вируса. Однократное замораживание и размораживание в использованном режиме снижает репродуктивный титр вируса в культуральной суспензии на 0,50 – 0,75 lgТЦД<sub>50</sub>, который в пересчете на общее количество вирусных частиц составляет от 68 до 82 %.

Изучение условия хранения вирусных суспензий, используемых при проведении различных исследовательских работ и производство биопрепаратов имеет важное значение. Так как, работая с живым вирусом SARS-CoV-2 в лаборатории, мы неожиданно столкнулись с интересной ситуацией. При постановке реакции нейтрализации нами использованный контрольный вирус не вызывал цитопатические действия в культуре клеток. Данный вирус хранился при температуре 4 °C в течение 18 часов перед постановкой реакции. В связи с этим, мы решили изучить сохраняемость вируса SARS-CoV-2 при различных температурных режимах в виде суспензии. Анализируя результаты нашего эксперимента, мы пришли к следующему выводу. Так, во время любой работы или эксперименте с живым вирусом при температурах 37 °C, 22 °C и 4 °C отрицательно влияет на инфекционную активность вируса. Поэтому для того чтобы сохра-

нить жизнеспособность вируса, мы рекомендуем использовать белковые стабилизаторы, такие как бычьи сыворотки в качестве протектора.

Аналогичная работа была проведена другими исследователями, в результате которой была установлена, что вирус SARS-CoV-2 сохраняется в течение 14, 7 и 1 день среде DMEM при температурах 4 °С, 22 °С и 37 °С, соответственно. Когда температура была повышена до 56 °С и 70 °С, время сохранения инфекционного титра резко сократилось до 10 и 1 мин соответственно [39]. Ряд исследователей изучали стабильность вируса SARS-CoV-1 при вышеуказанных температурах [40, 41, 42], в результатах которых сохранялся вирус от 30 мин до 2 часов в зависимости от температуры хранения. Следует отметить, что Rabenau et al. [42] показали, что добавление 20% сыворотки КРС к вирусной суспензии благоприятно влияет на сохраняемость инфекционного титра вируса SARS-CoV-1 при 4 °С и 56 °С. Снижение инфекционности вируса из-за повышения температуры также было отмечено для коронавирусов животных, таких как коронавирус мыши (MCoV или MHV) и коронавирус собак (CCoV) в среде MEM, а также для вируса TGEV в буфере NEPES [43, 44].

Данные о влиянии химических факторов при работе с возбудителями болезней необходимы для создания условий биологической безопасности для персонала и окружающей среды, а также конструирования технологий изготовления биологических препаратов диагностического и профилактического назначения. Анализ литературных источников показали, что для инактивации вирусов Sars-CoV и Sars-CoV-2 испытаны различные химические агенты такие как, глутаральдегид, бета пропиолактон, метанол, пара формальдегид, формальдегид, додецилсульфат натрия, тризол, Triton X-100, Tween 20 или NP-40 [41, 42, 45, 46, 47] и др. В данном исследовании нами изучено влияние формальдегида к вирусу, так как формалин (разбавленный формальдегид) успешно использовался для инактивации вирусов в течение нескольких лет при приготовлении противовирусных вакцин [48 – 54]. Он также использовался в качестве агента фиксации клеток и тканей. Кроме того, формалин является не дорогим, легкодоступным химическим агентом, который можно использовать в научных и производственных целях. Нашей целью не является детальное изучение вирулицидных свойств формальдегида, а изучение и разработка протокола инактивации вируса Sars-CoV-2, который будет

полезен для приготовления инактивированной вакцины против данной болезни.

В наших исследованиях обработка 0,1% и 0,05% растворами формальдегида при температурах 37 °С и 22 °С эффективно повлияет на инфекционность вируса Sars-CoV-2, тогда как инактивация вируса при 4°С с использованием указанных концентраций происходит медленнее и более длительное. Полученные результаты показывают, что инактивация вируса Sars-CoV-2 с помощью формалина зависит от концентрации формалина, температуры реакции, времени инкубации. В других исследованиях подтверждено, что формалин может изменить антигенную структуру вириона [55, 56]. Было показано, что инактивация формалина изменяет антигенные свойства и снижает иммуногенность вакцин, таких как вирус гепатита А и В, вирус полиомиелита, вирус герпеса крупного рогатого скота и вирус гриппа на моделях мышей [57 – 61]. В наших экспериментах вирус сохранил свою морфологическую целостность при просмотре электронной микроскопии после обработки его формальдегидом и формировали иммунитет у вакцинированных хомяков (результаты не показаны). При определении полноты инактивации инактивированной суспензии в клетках Vero показали полную инактивацию вируса, где при трехкратном пассировании не наблюдалось каких-либо изменений (отсутствие ЦПД вируса в культуре клеток) как в контрольных, так и в инфицированных клетках, что подтверждает авирулентность тестируемых проб.

Таким образом, нами проведенные исследования относятся к классической вирусологии, которая является основой современной вирусологии. Поэтому ее необходимо развивать вместе с современной молекулярной вирусологией. Изучение нового вируса Sars-CoV-2, приведшего к глобальной пандемии, носит в основном молекулярный характер и фокусируется на происхождении вируса путем изучения его генома. Следовательно, физические, химические и биологические свойства вируса изучены недостаточно. Результаты исследований в этой области, как мы видели из нашего исследования, часто противоречивы. Это может быть связано с тем, что классическая вирусология сложна, трудоемкая и занимает много времени. Однако мы считаем, что классическая вирусология позволяет разрабатывать протоколы лечения, определять патогенез заболевания и проводить другие но-

вые исследования, позволяя полностью изучить эти свойства вируса.

### Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

### Источник финансирования

Работа была выполнена в рамках научно-технической программы на тему: «Разработка вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19» (ИРН № 64356/ПЦФ-МОН-РК-

ОТ-20) по целевому финансированию на 2020 – 2022 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

### Благодарности

Выражаем старшему научному сотруднику лаборатории «Молекулярной биологии и генной инженерии» Кожабергенову Нурлану Сиязбековичу за предоставление электронной фотографии вируса SARS-CoV-2, а также сотрудникам НИИПББ которые принимали непосредственное участие в экспериментах приводившихся в данной статье.

### Литература

- 1 Lau, S.K.P., Chan, J.F.W. Coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens in humans and animals.// *Virology* 2015. vol. 31,4 1-13. doi.org/10.1186/s12985-015-0432-z
- 2 To KK, Hung IF, Chan JF, Yuen KY. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses.// *J Thorac Dis* 2013. vol. 9,4 1910-7. doi:10.1128/JVI.02685-15.
- 3 Weiss, Susan R, and Sonia Navas-Martin. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus.//*Microbiology and molecular biology reviews* 2005. vol. 69,4. 635-64. doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005
- 4 Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses.//*Trends Microbiol* 2016. vol. 24,6. 490-502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003
- 5 Lim YX, Ng YL, Tam JP, Liu DX. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions.// *Diseases*. 2016. vol. 4,3 26. 25 doi:10.3390/diseases4030026.
- 6 Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses.// *Int J Biol Sci* 2020. vol.16(10):1686-1697. doi:10.7150/ijbs.45472.
- 7 Mackenzie JS, Smith DW. COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't [published online ahead of print, 2020 Mar 17].// *Microbiol Aust*. 2020. MA20013. doi:10.1071/MA20013
- 8 Maukayeva, S., Karimova, S.. Epidemiologic character of COVID-19 in Kazakhstan: A preliminary report.//*Northern clinics of Istanbul* 2020. vol.7(3), 210–213. https://doi.org/10.14744/nci.2020.62443
- 9 Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2.// *Nat Med*. 2020. vol. 26,4: 450-452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
- 10 Shu-Miaw Chaw, Jui-Hung Tai, Shi-Lun Chen, Chia-Hung Hsieh, Sui-Yuan Chang, Shiou-Hwei Yeh, Wei-Shiung Yang, Pei-Jer Chen, Hung-Yi Wang. The origin and underlying driving forces of the SARS-CoV-2 outbreak.//*J Biomed Sci* 2020. vol. 27-73. doi.org/10.1186/s12929-020-00665-8
- 11 Malaiyan, J, Arumugam, S, Mohan, K, Gomathi Radhakrishnan, G. An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues.//*J Med Virol*. 2020. vol.1– 7. https://doi.org/10.1002/jmv.26261
- 12 Mercatelli D., Giorgi F.M. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. //*Frontiers in Microbiology* 2020. vol..11, P.1800 https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01800
- 13 Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., Duan, Y., Zhang, H., Wang, Y., Qian, Z., Cui, J., & Lu, J.. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2.//*National Science Review* 2020. nwa036. https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036
- 14 Kaur, N., Singh, R., Dar, Z., Bijarnia, R. K., Dhinra, N., & Kaur, T.. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2.//*Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2020. vol. 89 (2021): 104490. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104490
- 15 Xiaolu Tang, Changcheng Wu, Xiang Li, Yuhe Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Hong Zhang, Yirong Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Jian Lu, On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. //*National Science Review* 2020. vol. 7. 1012–1023 doi.org/10.1093/nsr/nwaa036
- 16 Wang, H., Li, X., Li, T., Zhang, S., Wang, L., Wu, X., & Liu, J. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2.//*European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2020.vol.39(9), 1629–1635. doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4



- 17 Junejo, Y., Ozaslan, M., Safdar, M., Khailany, R. A., Rehman, S., Yousaf, W., & Khan, M. A.. Novel SARS-CoV-2/COVID-19: Origin, pathogenesis, genes and genetic variations, immune responses and phylogenetic analysis.// *Gene reports* 2020. 20, 100752. doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100752
- 18 Islam, M.R., Hoque, M.N., Rahman, M.S., Alam, A., Akther, M., Puspo, J. A., Akter, S., Sultana, M., Crandall, K.A., & Hossain, M.A.. Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity.// *Sci Rep* 2020. 10, 14004 . doi.org/10.1038/s41598-020-70812-6
- 19 V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V.. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. // *Nat Rev Microbiol* 2020. 19(3), 155–170. doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6
- 20 Scheller, C., Krebs, F., Minkner, R., Astner, I., Gil-Moles, M., & Wätzig, H.. Physicochemical properties of SARS-CoV-2 for drug targeting, virus inactivation and attenuation, vaccine formulation and quality control. // *Electrophoresis* 2020. 41(13-14), 1137–1151. doi.org/10.1002/elps.202000121
- 21 Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., Bu, Z.. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2.// *Science (New York.)* 2020. 368(6494), 1016–1020. doi.org/10.1126/science.abb7015
- 22 Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, Kaewpreedee P, Perera RAPM, Poon LLM, Nicholls JM, Peiris M, Yen HL. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. // *Nature*. 2020. 583(7818):834-838. doi: 10.1038/s41586-020-2342-5.
- 23 Harrison A.G., Lin T. and Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. // *Trends in Immunology* 2020. Vol. 41, No. 12 doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004
- 24 Khalaf K, Papp N, Chou JT-T, Hana D, Mackiewicz A and Kaczmarek M. SARS-CoV-2: Pathogenesis, and Advancements in Diagnostics and Treatment.// *Front. Immunol* 2020. 11:570927. doi: 10.3389/fimmu.2020.570927
- 25 WHO/WHE/CPI/2019.20 Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019– 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325884/WHO-WHE-CPI-2019.20-eng.pdf?ua=1>
- 26 WHO Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV). [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2)
- 27 Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 8 сентября 2017 года № 684
- 28 Reed, L. J. & Muench, H. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints12. // *American Journal of Epidemiology* 1938. 27, 493–497, doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
- 29 Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. // *Euro Surveill*. 2020. 25(3):pii=2000045. doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- 30 Yao P, Zhang Y, Sun Y, Gu Y, Xu F, Su B, Chen C, Lu H, Wang D, Yang Z, Niu B, Chen J, Xie L, Chen L, Zhang Y, Wang H, Zhao Y, Guo Y, Ruan J, Zhu Z, Fu Z, Tian D, An Q, Jiang J, Zhu H. Isolation and Growth Characteristics of SARS-CoV-2 in Vero Cell. // *Virology*. 2020. 35(3):348-350. doi:10.1007/s12250-020-00241-2.
- 31 Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K.. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) //Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics* 2020. 23–31. doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7\_3
- 32 Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. // *Lancet*. 2020. vol. 22;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- 33 Chu H., Chan J.F., Yuen T.T, Shuai H., Yuan Sh, Wang Y., Hu B., Yip C.C, Tsang J.O., Huang X., Chai Y., Yang D., Hou Y., Chik K.K, Zhang X., Fung A.Y., Tsoi H., Cai J., Chan W., Ip J.D, Chu A.W, Zhou J., Lung D.Ch, Kok K., To K.K., Tsang O.T., Chan K.H., Yuen K. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study // *The Lancet Microbe* 2020.2666-5247. doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5.
- 34 Lau SY, Wang P, Mok BW, Zhang AJ, Chu H, Lee AC, Deng S, Chen P, Chan KH, Song W, Chen Z, To KK, Chan JF, Yuen KY, Chen H. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. // *Emerg Microbes Infect*. 2020. vol. 9(1). 837-842. doi: 10.1080/22221751.2020.1756700.
- 35 Li, L., Li, X., Guo, Z., Wang, Z., Zhang, K., Li, C., Wang, C., & Zhang, S.. Influence of Storage Conditions on SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection in Throat Swabs. // *The Journal of infectious diseases* 2020, vol.222(2). 203–205. doi.org/10.1093/infdis/jiaa272
- 36 Garrett A. Perchetti, Meei-Li Huang, Vikas Peddu, Keith R. Jerome, Alexander L. Greninger Stability of SARS-CoV-2 in Phosphate-Buffered Saline for Molecular Detection. // *Journal of Clinical Microbiology* 2020. vol. 58 (8) e01094-20; doi.org/10.1128/JCM.01094-20
- 37 Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A., & Goyal, S. M.. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. // *Transboundary and emerging diseases* 2020, 10.1111/tbed.13707. Advance online publication. doi.org/10.1111/tbed.13707

- 38 Paggiaro AO, Carvalho VF, Gemperli R. Effect of different human tissue processing techniques on SARS-CoV-2 inactivation-review. // *Cell Tissue Bank* 2021. vol. 22(1):1-10. doi:10.1007/s10561-020-09869-6.
- 39 Chin AWH, Chu JTS, Perera MRA, Hui KPY, Yen HL, Chan MCW, Peiris M, Poon LLM. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. // *Lancet Microbe*. 2020. vol.1(1):e10. doi:10.1016/S2666-5247(20)30003-3.
- 41 Duan SM, Zhao XS, Wen RF, Huang JJ, Pi GH, Zhang SX, Han J, Bi SL, Ruan L, Dong XP; SARS Research Team. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. // *Biomed Environ Sci*. 2003. vol.16(3):246-55. PMID:14631830.
- 42 Darnell ME, Subbarao K, Feinstone SM, Taylor DR. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *J Virol Methods*. 2004 Oct;121(1):85-91. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.06.006. PMID: 15350737; PMCID: PMC7112912.
- 43 Rabenau HF, Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Preiser W, Doerr HW. Stability and inactivation of SARS coronavirus. // *Med Microbiol Immunol*. 2005. vol. 194(1-2):1-6. doi: 10.1007/s00430-004-0219-0
- 44 Laude H. Thermal inactivation studies of a coronavirus, transmissible gastroenteritis virus. // *J Gen Virol*. 1981. vol.;56(Pt 2):235-40. doi: 10.1099/0022-1317-56-2-235.
- 45 Saknimit M, Inatsuki I, Sugiyama Y, Yagami K. Virucidal efficacy of physico-chemical treatments against coronaviruses and parvoviruses of laboratory animals. // *Jikken Dobutsu*. 1988 vol.37(3):341-5. doi: 10.1538/expanim1978.37.3\_341.
- 46 Jureka, A. S., Silvas, J. A., & Basler, C. F.. Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2. // *Viruses* 2020. vol.12(6), 622. doi.org/10.3390/v12060622
- 47 Edward I Patterson, Tessa Prince, Enyia R Anderson, Aitor Casas-Sanchez, Shirley L Smith, Cintia Cansado-Utrilla, Tom Solomon, Michael J Griffiths, Álvaro Acosta-Serrano, Lance Turtle, Grant L Hughes, Methods of Inactivation of SARS-CoV-2 for Downstream Biological Assays. // *The Journal of Infectious Diseases* 2020. vol. 222. 1462–1467. doi.org/10.1093/infdis/jiaa507
- 48 Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, Jones M, Hannah MJ, Evans R, Burton C, Burton JE, Guiver M, Cane PA, Woodford N, Bruce CB, Roberts ADG, Killip MJ. Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. // *J Clin Microbiol* 2020. 58:e01713-20. doi.org/10.1128/JCM.01713-20.
- 49 Delrue I, Verzele D, Madder A, Nauwynck HJ. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. // *Expert Rev Vaccines*. 2012. vol.11(6):695-719. doi:10.1586/erv.12.38.
- 50 Schiøler KL, Samuel M, Wai KL. Vaccines for preventing Japanese encephalitis. // *Cochrane Database Syst Rev*. 2007. (3):CD004263. doi:10.1002/14651858.
- 51 Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H. Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. // *Vaccine* 2003. vol.4;21(23):3212-8. doi:10.1016/s0264-410x(03)00234-2.
- 52 Werzberger, A., Mensch, B., Kuter, B., Brown, L., Lewis, J., Sitrin, R., Miller, W., Shouval, D., Wiens, B., & Calandra, G. . A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. // *N Engl J Med*. 1992. 13;327(7):453-7. doi: 10.1056/NEJM199208133270702.
- 53 Murphey-Corb, M., Martin, L. N., Davison-Fairburn, B., Montelaro, R. C., Miller, M., West, M., Ohkawa, S., Baskin, G. B., Zhang, J. Y., & Putney, S. D. A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. // *Science*. 1989. vol.8;246(4935):1293-7. doi:10.1126/science.2555923.
- 54 Ogra PL, Ogra SS. Local antibody response to poliovaccine in the human female genital tract. // *J Immunol* 1973. vol.110(5):1307-11. PMID: 4633297.
- 55 Kissling RE, Reese DR. Anti-Rabies Vaccine of Tissue Culture Origin. // *J Immunol* 1963. vol.91: 362–368. pmid:14071026
- 56 Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. // *Vet Pathol*. 2005. vol.42(4):405-26. doi:10.1354/vp.42-4-405.
- 57 Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem*. 2004 Feb 20;279(8):6235-43. doi: 10.1074/jbc.M310752200.
- 58 Furuya Y, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Müllbacher A, Alsharifi M. Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations. // *J Gen Virol*. 2010/ vol.91(Pt 6):1450-60. doi:10.1099/vir.0.018168-0.
- 59 Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu B, Miyamura T. Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains. // *Vaccine*. 2007. vol. 10;25(41):7041-6. doi:10.1016/j.vaccine.2007.07.060.
- 60 Duque H, Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. // *Vaccine* 1989. vol.7: 513–520. pmid:2481909
- 61 Peterson DL, Paul DA, Lam J, Tribby II, Achord DT. Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. // *J Immunol* 1984. vol.132: 920–927.
- 62 Wilton T, Dunn G, Eastwood D, Minor PD, Martin J. Effect of formaldehyde inactivation on poliovirus. // *J Virol*. 2014. vol;88(20):11955-64. doi: 10.1128/JVI.01809-14.

## References

- 1 Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A., & Goyal, S. M. (2020). Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transboundary and emerging diseases*, 10.1111/tbed.13707. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/tbed.13707>
- 2 Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. vol. 26,4: 450-452. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
- 3 Chin A.W.H., Chu J.T.S., Perera M.R.A., Hui K.P.Y., Yen H.-L., Chan M.C.W., Poon L.L.M. (2020). Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe*, 10.1016/S2666-5247(20)30003-3.
- 4 Chu H., Chan J.F., Yuen T.T., Shuai H., Yuan Sh, Wang Y., Hu B., Yip C.C, Tsang J.O., Huang X., Chai Y., Yang D., Hou Y., Chik K.K, Zhang X., Fung A.Y., Tsoi H., Cai J., Chan W., Ip J.D, Chu A.W, Zhou J., Lung D.Ch, Kok K., To K.K., Tsang O.T., Chan K.H., Yuen K (2020). Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study *The Lancet Microbe*.2666-5247. doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5.
- 5 Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reuske Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 25(3):pii=2000045. doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- 6 Darnell M.E., Subbarao K., Feinstone S.M., & Taylor D.R. (2004). Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *Journal of Virological Methods*, 121(1), 85–91. 10.1016/j.jviromet.2004.06.006
- 7 Duan S.M., Zhao, X.S., Wen R.F., Huang J.J., Pi G.H., Zhang S.X. SARS Research Team. (2003). Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 16(3), 246.
- 8 Duque H, Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ (1989) Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine* 7: 513–520. pmid:2481909
- 9 Edward I Patterson, Tessa Prince, Enyia R Anderson, Aitor Casas-Sanchez, Shirley L Smith, Cintia Cansado-Utrilla, Tom Solomon, Michael J Griffiths, Álvaro Acosta-Serrano, Lance Turtle, Grant L Hughes (2020). Methods of Inactivation of SARS-CoV-2 for Downstream Biological Assays. *The Journal of Infectious Diseases*. vol. 222. 1462–1467. doi.org/10.1093/infdis/jiaa507
- 10 Furuya Y, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Mullbacher A, et al. (2010) Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations. *J Gen Virol* 91: 1450–1460. pmid:20147516
- 11 Garrett A. Perchetti, Meei-Li Huang, Vikas Peddu, Keith R. Jerome, Alexander L(2020). Greninger Stability of SARS-CoV-2 in Phosphate-Buffered Saline for Molecular Detection. *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 58 (8) e01094-20; doi.org/10.1128/JCM.01094-20
- 12 Harrison A.G., Lin T. and Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. //Trends in Immunology 2020. Vol. 41, No. 12 doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004
- 13 Iris Delrue, Dieter Verzele, Annemieke Madder & Hans J Nauwynck (2012) Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges, *Expert Review of Vaccines*, 11:6, 695-719, DOI: 10.1586/erv.12.38
- 14 Islam, M. R., Hoque, M. N., Rahman, M. S., Alam, A., Akther, M., Puspo, J. A., Akter, S., Sultana, M., Crandall, K. A., & Hossain, M. A. (2020). Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity. *Sci Rep* . 10, 14004 . doi.org/10.1038/s41598-020-70812-6
- 15 Junejo, Y., Ozaslan, M., Safdar, M., Khailany, R. A., Rehman, S., Yousaf, W., & Khan, M. A. (2020). Novel SARS-CoV-2/COVID-19: Origin, pathogenesis, genes and genetic variations, immune responses and phylogenetic analysis. *Gene reports*, 20, 100752. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100752>
- 16 Jureka, A. S., Silvas, J. A., & Basler, C. F. (2020). Propagation, Inactivation, and Safety Testing of SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(6), 622. <https://doi.org/10.3390/v12060622>
- 17 Kaur, N., Singh, R., Dar, Z., Bijarnia, R. K., Dhingra, N., & Kaur, T. (2020). Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 104490. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104490>
- 18 Khalaf K, Papp N, Chou JT-T, Hana D, Mackiewicz A and Kaczmarek M (2020) SARS-CoV-2: Pathogenesis, and Advancements in Diagnostics and Treatment. *Front. Immunol*. 11:570927. doi: 10.3389/fimmu.2020.570927
- 19 Kissling RE, Reese DR (1963) Anti-Rabies Vaccine of Tissue Culture Origin. *J Immunol* 91: 362–368. pmid:14071026
- 20 Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics* , 23–31. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3)
- 21 Lau, S.K.P., Chan, J.F.W (2015). Coronaviruses: emerging and re-emerging pathogens in humans and animals. *Virol J* . vol. 31,4 1-13. doi.org/10.1186/s12985-015-0432-z
- 22 Lau SY, Wang P, Mok BW, Zhang AJ, Chu H, Lee AC, Deng S, Chen P, Chan KH, Song W, Chen Z, To KK, Chan JF, Yuen KY, Chen H (2020). Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg Microbes Infect*. vol. 9(1). 837-842. doi: 10.1080/22221751.2020.1756700.

- 23 Laude, H. (1981). Thermal inactivation studies of a coronavirus, transmissible gastroenteritis virus. *Journal of General Virology*, 56(2), 235–240. 10.1099/0022-1317-56-2-235
- 24 Lim YX, Ng YL, Tam JP, Liu DX (2016). Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*. vol. 4,3 26. 25 doi:10.3390/diseases4030026.
- 25 Li, L., Li, X., Guo, Z., Wang, Z., Zhang, K., Li, C., Wang, C., & Zhang, S. (2020). Influence of Storage Conditions on SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection in Throat Swabs. *The Journal of infectious diseases*, 222(2), 203–205. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa272>
- 26 Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. vol. 22;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- 27 Mackenzie JS, Smith DW (2020). COVID-19: a novel zoonotic disease caused by a coronavirus from China: what we know and what we don't. *Microbiol Aust*. MA20013. doi:10.1071/MA20013
- 28 Maukayeva, S., & Karimova, S. (2020). Epidemiologic character of COVID-19 in Kazakhstan: A preliminary report. *Northern clinics of Istanbul*, 7(3), 210–213. <https://doi.org/10.14744/nci.2020.62443>
- 29 Malaiyan, J, Arumugam, S, Mohan, K, Gomathi Radhakrishnan, G (2020). An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues. *J Med Virol*. . vol.1– 7. <https://doi.org/10.1002/jmv.26261>
- 30 Mercatelli D., Giorgi F.M (2020). Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. *Frontiers in Microbiology*. vol..11,. P.1800 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01800>
- 31 Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, et al. (2004) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 279: 6235–6243. pmid:14638685
- 32 Murphey-Corb M, Martin LN, Davison-Fairburn B, Montelaro RC, Miller M, et al. (1989) A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science* 246: 1293–1297. pmid:2555923
- 33 Ogra PL, Ogra SS (1973) Local antibody response to poliovaccine in the human female genital tract. *J Immunol* 110: 1307–1311. pmid:4633297
- 34 Paggiaro AO, Carvalho VF, Gemperli R (2021). Effect of different human tissue processing techniques on SARS-CoV-2 inactivation-review. *Cell Tissue Bank*. vol. 22(1):1-10. doi:10.1007/s10561-020-09869-6
- 35 Peiris M, Yen HL (2020). Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 583(7818):834-838. doi: 10.1038/s41586-020-2342-5.
- 36 Peterson DL, Paul DA, Lam J, Tribby II, Achord DT (1984) Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 132: 920–927. pmid:6197478
- 37 Rabenau, H. F. , Cinatl, J. , Morgenstern, B. , Bauer, G. , Preiser, W. , & Doerr, H. W. (2005). Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical Microbiology and Immunology*, 194(1–2), 1–6. 10.1007/s00430-004-0219-0
- 38 Ramos-Vara JA (2005) Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42: 405–426. pmid:16006601
- 39 Reed, L. J. & Muench, H. A (1938). Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints12. *American Journal of Epidemiology* . 27, 493–497, doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
- 40 Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, испол'зующим потенциал'но опасны'е химические и биологические вещества. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 8 сентября 2017 года № 684 [Sanitary and epidemiological requirements for laboratories using potentially dangerous chemical and biological substances. Order of the Minister of Health of the Republic of Kazakhstan dated September 8, 2017 No. 684]
- 41 Saknimit, M. , Inatsuki, I. , Sugiyama, Y. , & Yagami, K. I. (1988). Virucidal efficacy of physic chemical treatments against coronaviruses and parvoviruses of laboratory animals. *Experimental Animals*, 37(3), 341–345. 10.1538/expanim1978.37.3\_341
- 42 Scheller, C., Krebs, F., Minkner, R., Astner, I., Gil-Moles, M., & Wätzig, H. (2020). Physicochemical properties of SARS-CoV-2 for drug targeting, virus inactivation and attenuation, vaccine formulation and quality control. *Electrophoresis*, 41(13-14), 1137–1151. <https://doi.org/10.1002/elps.202000121>
- 43 Schioler KL, Samuel M, Wai KL (2007) Vaccines for preventing Japanese encephalitis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004263. pmid:17636750
- 44 Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., ... Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- 45 Shu-Miaw Chaw, Jui-Hung Tai, Shi-Lun Chen, Chia-Hung Hsieh, Sui-Yuan Chang, Shiou-Hwei Yeh, Wei-Shiung Yang, Pei-Jer Chen, Hurng-Yi Wang (2020) The origin and underlying driving forces of the SARS-CoV-2 outbreak. *J Biomed Sci*. vol. 27-73. doi.org/10.1186/s12929-020-00665-8
- 46 Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, Kaewpreedee P, Perera RAPM, Poon LLM, Nicholls JM, WHO/WHE/CPI/2019.20 Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019– 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325884/WHO-WHE-CPI-2019.20-eng.pdf?ua=1>
- 47 Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol*. vol. 24,6. 490-502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003



- 48 Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., Duan, Y., Zhang, H., Wang, Y., Qian, Z., Cui, J., & Lu, J. (2020). On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*, nwaa036. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>
- 49 Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu B, et al. (2007) Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains. *Vaccine* 25: 7041–7046. pmid:17825459
- 50 Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H (2003) Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* 21: 3212–3218. pmid:12804850
- 51 To KK, Hung IF, Chan JF, Yuen KY (2013). From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis.* vol. 90,4 1910-7. doi:10.1128/JVI.02685-15.
- 52 V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* . 19(3), 155–170. doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6
- 53 Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Jian Lu (2020) , On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*. vol. 7. 1012–1023 doi.org/10.1093/nsr/nwaa036
- 54 Wang, H., Li, X., Li, T., Zhang, S., Wang, L., Wu, X., & Liu, J. (2020). The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 39(9), 1629–1635. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4>
- 55 Weiss, Susan R, and Sonia Navas-Martin (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and molecular biology reviews*. vol. 69,4. 635-64. doi:10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005
- 56 Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, Jones M, Hannah MJ, Evans R, Burton C, Burton JE, Guiver M, Cane PA, Woodford N, Bruce CB, Roberts ADG, Killip MJ. (2020). Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. *J Clin Microbiol.* 58:e01713-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01713-20>
- 57 Werzberger A, Mensch B, Kuter B, Brown L, Lewis J, et al. (1992) A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. *N Engl J Med* 327: 453–457. pmid:1320740
- 58 Wilton T, Dunn G, Eastwood D, Minor PD, Martin J (2014) Effect of formaldehyde inactivation on poliovirus. *J Virol.* vol:88(20):11955-64. doi: 10.1128/JVI.01809-14
- 59 Xiaolu Tang, Changcheng Wu, Xiang Li, Yuhe Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Hong Zhang, Yirong WHO Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV). [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2)
- 60 Yao P, Zhang Y, Sun Y, Gu Y, Xu F, Su B, Chen C, Lu H, Wang D, Yang Z, Niu B, Chen J, Xie L, Chen L, Zhang Y, Wang H, Zhao Y, Guo Y, Ruan J, Zhu Z, Fu Z, Tian D, An Q, Jiang J, Zhu H. (2020). Isolation and Growth Characteristics of SARS-CoV-2 in Vero Cell. *Virol Sin.* 35(3):348-350. doi:10.1007/s12250-020-00241-2.
- 61 Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY (2020). Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci.* vol.16(10):1686-1697. doi:10.7150/ijbs.45472.

А.Ж. Хастаева\*  , А.А. Бектурганова  ,  
А.М. Омаралиева 

Казахский университет технологии и бизнеса, Казахстан, г. Нур-Султан

\*e-mail: gera\_or@mail.ru

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРЕЧИХИ КАК СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА РАСТИТЕЛЬНОГО МОЛОКА

Один из важнейших факторов, оказывающий негативное влияние на здоровье населения РК – нарушение рациона питания, обусловленное недостаточным потреблением полноценных белков, витаминов, макро- и микроэлементов и нерациональным их соотношением.

В Казахстане зерновые культуры производятся в больших объемах, но отсутствует производство напитков на основе растительного сырья, хотя производство растительного молока уже широко распространено во всем мире. Использование местного растительного сырья из разных регионов Казахстана в технологии производства зерновых молочных напитков является актуальным и перспективным направлением в пищевой промышленности.

В статье представлены результаты исследования качества гречихи селекционных сортов «Шортандинская», «Батыр» и «Саулык». В ходе исследования образцы гречихи были оценены на физико-химические, технологические свойства и показатели безопасности.

В ходе исследования выявилось, что исследуемые образцы зерен гречихи по показателю безопасности соответствуют требованиям Технического Регламента Таможенного Союза «О безопасности зерна». Полученные научные данные в ходе выполнения проекта, будут использоваться для разработки новых технологий зерновых «молочных» напитков, обогащенных Омега-3- полиненасыщенными жирными кислотами.

Результатом реализации данного НИР станет расширение ассортимента напитков для здорового и безопасного питания населения.

**Ключевые слова:** гречиха, углеводы, белок, жир, безопасность.

A.Zh. Khastaeva\*, A.A. Bekturganova, A.M. Omaralieva  
Kazakh University of Technology and Business, Kazakhstan, Nur-Sultan  
\*e-mail: gera\_or@mail.ru

### The use of buckwheat as a raw material for the production of vegetable milk

One of the most important factors that has a significant impact on the health of the population of the Republic of Kazakhstan is a violation of the diet due to insufficient consumption of full-fledged proteins, vitamins, macro- and microelements and their irrational ratio.

In Kazakhstan, grain crops are produced in large volumes, but there is no production of beverages based on vegetable raw materials, although the production of vegetable milk is already widespread throughout the world. The use of local vegetable raw materials from different regions of Kazakhstan in the production technology of grain milk drinks is an urgent and promising direction in the food industry.

The article presents the results of a study of the quality of buckwheat breeding varieties “Shortandin-skaya”, “Batyr” and “Saulyk”. During the study, buckwheat samples were evaluated physico-chemical, technological properties and safety indicators.

All the studied samples of buckwheat grains in terms of safety meet the requirements of the Technical Regulations of the Customs Union “On grain safety”. The scientific data obtained during the implementation of the project will become the basis for the creation of new grain “milk” drinks enriched with Omega-3 polyunsaturated fatty acids.

The result of the implementation of this research will be the expansion of the range of beverages for healthy and safe nutrition of the population.

**Key words:** buckwheat, carbohydrates, protein, fat, safety.

А.Ж. Хастаева\*, А.А. Бектұрғанова, А.М. Омаралиева  
Қазақ технология және бизнес университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.  
\*e-mail: gera\_or@mail.ru

### Қарақұмықты өсімдік сүтін өндіру үшін шикізат ретінде пайдалану

Қазақстан Республикасы халқының денсаулығына елеулі әсер ететін маңызды факторлардың бірі – толыққанды ақуыздарды, дәрумендерді, макро – және микроэлементтерді жеткіліксіз тұтынудан және олардың ұтымсыз арақатынасынан туындаған тамақтану рационының бұзылуы.

Қазақстанда дәнді дақылдар үлкен көлемде өндіріледі, бірақ өсімдік сүті өндірісі бүкіл әлемде кең таралғанына қарамастан, өсімдік шикізаты негізінде жасалған сусындар өндірісі жоқ. Дәнді сүт сусындарын өндіру технологиясында Қазақстанның әртүрлі өңірлерінен жергілікті өсімдік шикізатын пайдалану тамақ өнеркәсібіндегі өзекті және перспективалы бағыт болып табылады.

Мақалада «Шортанды», «Батыр» және «Саулық» селекциялық сұрыптарындағы қарақұмықтың сапасын зерттеу нәтижелері келтірілген. Зерттеу барысында қарақұмық үлгілерінің физика-химиялық, технологиялық қасиеттері мен қауіпсіздік көрсеткіштері бағаланды.

Зерттеу барысында қарақұмық дәндерінің зерттелген үлгілері қауіпсіздік көрсеткіші бойынша «Астық қауіпсіздігі туралы» Кеден одағының техникалық регламентінің талаптарына сәйкес келетіні анықталды. Жобаны орындау барысында алынған ғылыми деректер Омега-3 – полиқанықпаған май қышқылдарымен байытылған дәнді «сүт» сусындарының жаңа технологияларын әзірлеу үшін пайдаланылатын болады.

Осы ғылыми зерттеу жұмысын іске асырудың нәтижесі халықтың дұрыс және қауіпсіз тамақтануы үшін сусындардың ассортиментін кеңейту болып табылады.

**Түйін сөздер:** қарақұмық, көмірсулар, ақуыз, май, қауіпсіздік.

### Введение

Молоко и молочные продукты – это пищевые продукты, которые являются полноценным источником белка, жирных кислот, минералов, витаминов и ферментов. При этом диетологи мира отмечают растущую тенденцию к увеличению числа людей с непереносимостью определенных видов питательных веществ, необходимых для нормального функционирования организма или которых трудно избежать при формировании рациона. Данное нарушение часто связано с нарушением ферментативных процессов в организме человека [1,2]. Примером такого нутриента является лактоза, непереносимость лактозы у взрослых очень распространена и не всегда может считаться излечимым заболеванием. Из-за широкого употребления молочных продуктов и распространения воспалительных заболеваний кишечника многие люди испытывают временную непереносимость. Дефицит лактазы у взрослых может быть частичным и полным. С каждым годом все большее количество людей испытывают дискомфорт при потреблении лактозосодержащих продуктов, что приводит к сокращению их потребления. В связи с этим необходимо расширять ассортимент специализированных, безлактозных продуктов питания. Одним из возможных решений проблемы явля-

ется разработка технологии получения растительного молока из местного зернового сырья.

В настоящее время разработаны новые функциональные продукты питания, которые включают в себя различные компоненты, необходимые для здоровья, такие как биологически активные соединения, выделенные из растений, полиненасыщенные жирные кислоты, пробиотики, пребиотики, минералы и витамины [3–6].

В качестве обогащаемой базы обычно используются продукты массового потребления. Такой подход позволяет с учетом внесения дополнительных сырьевых компонентов сбалансировать продукты по составу белка, повысить содержание пищевых волокон, витаминов и микроэлементов до рекомендуемых норм потребления [7, 8].

В последнее десятилетие отношение людей, особенно социально активных слоев населения, к собственному здоровью существенно изменилось. Стремление вести здоровый образ жизни формирует интерес потребителей к правильно сбалансированному питанию, увеличивает спрос на продукты с природными натуральными компонентами и диктует отказ от искусственных пищевых добавок.

У современного потребителя постепенно формируется новый подход к выбору продуктов питания: многие стремятся питаться и одно-

временно получать только необходимые для организма белки, жиры, углеводы, а так же сохранять и укреплять свое здоровье, уменьшать риск развития заболеваний, повышать жизненный тонус, и даже снижать вес. Таким образом, перед производителями стоит задача поиска новых технологических и продуктовых решений, одним из которых является создание продуктов питания нового поколения – «функциональных продуктов».

Функциональные продукты питания – это продукты или пищевые ингредиенты, которые положительно влияют на здоровье человека в дополнение к их питательной ценности. Однако продукты здорового питания не являются лекарствами и не могут излечивать, но помогают предупредить болезни и старение организма. Функциональное питание подразумевает употребление в пищу продуктов, повышающих сопротивляемость человеческого организма заболеваниям и улучшающих многие физиологические процессы в организме человека, что позволяет ему долгое время сохранять активный образ жизни [9].

Наибольшее количество пищевых ингредиентов человек получает при употреблении жидких продуктов питания – напитков и также с экономической точки зрения важно при их изготовлении использовать местные природные ресурсы.

Активное развитие производства растительного молока связывается как с индивидуальной непереносимостью лактозы или молочного казеина и все большего числа потребителей с активной пропагандой вегетарианства и физиологической предпочтительности потребления растительного белка, особенно в геродиетическом питании [10–14]. В своё время подобные продукты были разработаны в качестве альтернативы животному молоку, в том числе для решения проблемы дефицита белка в экономически неразвитых странах и в настоящее время подобные продукты становятся все более популярным среди населения. Кроме непосредственного потребления в пищу, растительное молоко используется и в качестве основы для производства немолочных пробиотических и других продуктов традиционно молочного сектора – сливок, йогуртов, сыров, мороженого и прочих [1].

В последнее десятилетие стали популярны научные исследования о непереносимости лактозы большинством взрослых людей, а также расчёты экологов, указывающие на то, что

мясное и молочное животноводство наносит природе вред, несоразмерный его вкладу в человеческий рацион питания. Употребление «молочной альтернативы» становится частью имиджа современного человека, заботящегося о своём здоровье и о будущем планеты.

Изучение литературы по данной теме показало, что растительное молоко;

- обладает противовоспалительными свойствами кишечника, и облегчают аллергическую реакцию, вызванную едой, а также повышают усвоение железа организмом, казеин коровьего молока, добавки, вызывающие аллергию в его составе, как известно, препятствуют перевариванию железа.

- в таком молоке отсутствуют молочный альбумин и казеин, на которые может быть аллергия или плохое усвоение в кишечнике;

- отсутствует лактоза, непереносимость которой в последние годы наблюдается у всё большего количества людей, и усугубляется с возрастом;

- растительное молоко менее жирное;

- в состав растительного молока входят витамины С и Е, являющиеся отличными антиоксидантами;

- растительное молоко не содержит холестерина;

- в отличие от промышленно переработанного коровьего молока, растительное молоко не содержит гормоны, антибиотики и его крайне редко фальсифицируют.

Наиболее динамично рынок растительного молока развивается в США, где по данным Global Market Research, в 2016 году доля немолочного молока уже составляла 8 % объема рынка всех молочных продуктов и по прогнозам аналитиков, к концу 2018 года стоимостной эквивалент сегмента производства растительного молока достигла 4,5 млрд. \$. [10] В 2017 году был зафиксирован очередной виток роста рынка растительного молока и как предполагают аналитики, в ближайшие годы динамика роста будет сохраняться [15].

Темпы роста рассматриваемого сегмента мирового рынка в США составляют около 15,5% ежегодно, в Европе – около 7 % и с учетом этих темпов ожидается к 2022 году только в Европейских странах будет эквивалентен 9,5 млрд. \$ [16].

По другим данным аналитиков мировой рынок растительного молока составлял в объеме (2018г) 13 млрд.долларов и к 2026 году, по оценкам экспертов его доля может достичь объе-



ма 35,8 млрд. долларов со среднегодовым темпом роста около 13,6%.

В России подобное производство развивается ещё стремительнее: с 1,7 млн литров в 2017 году потребление растительного молока выросло до 12 млн литров в 2019 году.

Один из первых (исторически) видов растительного молока – соевое – постепенно сдает свои позиции [17]. В значительной степени это связано с недостаточно высокими органолептическими характеристиками соевого молока [12] и насыщением сырьевого рынка продуктами переработки генетически модифицированных сортов сои, что снижает доверие потребителей к этому продукту. В связи с этим потребительский рынок и производители переориентируются на альтернативные виды сырья, позволяющего в промышленных масштабах производить другие аналоги молока – миндальное [10], из зерна злаковых и масличных культур [12], кокосового и грецкого ореха, арахиса [18], фундука, кешью, из семян бахчевых культур [19], либо молоко смешанного состава – как рисово-миндальное и рисово-кокосовое (Riso Scotti, Италия), соево-кукурузное, соево-кокосовое, соевое с экстрактом чужбы, мультизерновые [16].

Если рассматривать общемировые тенденции развития сектора растительного молока, то следует отметить, что лишь в Австралии пока не особо развит интерес к рассматриваемому сегменту и сохраняются устойчивые рыночные позиции протеинов, молока и молочных напитков животного происхождения [20].

Растет популярность растительных аналогов молока, произведенных из орехов и злаков, поскольку они обладают более приемлемым и даже приятным вкусом и запахом по сравнению с соевым молоком и как следствие, миндальное, рисовое молоко в последние года вышли на 2-е и 3-е места в структуре продаж в странах Европы и в США [10].

Зерновые культуры потребляются во всем мире и считаются одним из важнейших источников углеводов, белков, пищевых волокон, минералов и витаминов в нашем рационе. Следовательно, они являются хорошим вариантом среди немолочного сырья для производства напитков [21].

Особое место среди питательных веществ злаков занимает пищевые волокна – клетчатка, на которую не влияют пищеварительные ферменты организма – гемицеллюлоза, пектин. Пищевые волокна участвуют в поддержании водного баланса, связывании и удалении водо-

растворимых токсинов, пищевых метаболитов, играют положительную роль в регулировании биохимических и физиологических процессов организма [22].

Гречневая крупа производится во многих странах и обладает такими характеристиками, как высокая экономическая ценность, легко употребляемая при универсальном использовании [23]. Поскольку гречиха легко адаптируется к экологии, ее можно выращивать практически везде и в разных местах обитания [24]. Как правило, гречневая крупа выращивается в северном полушарии, основными производителями являются Россия и Китай. Кроме того, его потребление растет в Соединенных Штатах, Канаде и Европе [25].

Гречневая крупа признана хорошим источником пищи, которая имеет питательную ценность благодаря содержанию белка, липидов, пищевых волокон и минералов, а также в сочетании с другими полезными для здоровья компонентами. Поэтому ему уделяется все большее внимание как потенциальному функциональному продукту питания. Аминокислотный состав и пищевая ценность гречневой крупы превосходят другие зерновые, также являясь одним из источников белка, обладающих высокой биологической ценностью [24]. В то же время гречневая крупа содержит минералы, такие как цинк, медь, марганец, селен, калий, натрий, кальций и магний, также она содержит витамины, такие как  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  и  $B_6$ ; флавоноиды, полифенолы, инозит, органическую кислоту и высокое содержание пищевых волокон [26]. Гречиху используют в рационе диетического питания, так как он имеет низкий гликемический индекс легкоусвояемых углеводов и высокий баланс незаменимых аминокислот [27].

Гречневая крупа оказывает много положительных эффектов на здоровье благодаря своему богатому и разнообразному питательному содержанию. Считается, что гречневая крупа может предотвратить возникновение таких заболеваний, как высокий уровень холестерина, гипертония, атеросклероз и диабет [24].

Продукты питания, защищающие от болезней, улучшающие состояние здоровья и снижающие риск заболеваний, определяются как функциональные продукты питания. Это приводит к росту потребления функциональных продуктов питания потребителями за счет увеличения доступности функциональных продуктов питания на рынке [28]. Гречневая крупа используется во

многих функциональных продуктов питания, производимых во всем мире [24]. Гречиха обладает огромным потенциалом в секторе функциональных продуктов питания, особенно из-за их высокого питательного состава. Это богатый источник фенольных соединений, фитостеринов, пагопирина, пищевых волокон, лигнанов, витаминов, минералов, антиоксидантов и ненасыщенных жирных кислот [29].

Использование гречневой крупы в качестве функционального питания, снижающего уровень холестерина, становится все более распространенным [30], и исследования *in vivo* и *in vitro* показывают, что гречневая крупа может регулировать уровень холестерина и предотвращать развитие сердечно-сосудистых заболеваний [31].

Качество зерна и продуктов его переработки характеризуется совокупностью технологических, биологических, физико-химических и потребительских свойств, которые зависят от сорта, почвы, климата, послеуборочной обработки и хранения. На этапах приемки, обработки, упаковки и хранения качество зерна меняется, и должна соответствовать требованиям Технического Регламента Таможенного Союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) и ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна» [32].

В научно-исследовательской работе гречиха используется в качестве сырья для разработки технологии растительных молочных напитков.

В связи с вышеизложенным, исследования направленные на разработку технологии производства растительных молочных напитков из отечественного сырья является актуальной, что позволит расширить ассортимент напитков для здорового и безопасного питания населения. Доступная сырьевая база в сочетании с новыми технологиями и оборудованием, практически неограниченным спросом на продукцию создадут предпосылки для бизнеса. Потенциал этого рынка будет привлекать внимание казахстанских производителей и реализация решений по производству позволит им успешно конкурировать с подобными продуктовыми линейками.

### Материалы и методы

Для исследования были отобраны 3 сорта гречихи: «Шортандинская», «Батыр» и «Саулык».

Приемку и отбор проб проводили по ГОСТ 13586.3-2015. Оценку качества отобранных об-

разцов гречихи проводили в соответствии с требованиями ГОСТ 19092-92 «Гречиха. Требования при заготовках и поставках»; ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна»; Массовую долю углеводов определяли Перманганатометрическим методом; массовую долю белка определяли согласно ГОСТ 10846-91; массовую долю жира определяли согласно ГОСТ 29033-91; токсичные элементы определяли атомно-абсорбционным методом согласно ГОСТ 30178-96.

Белок определяли по содержанию азота на анализаторе Кьельдаля UDK159. С помощью атомно-абсорбционного спектрометра «КВАНТ-Z.ЭТА» (Россия) проводили элементный анализ жидких проб различного происхождения и состава на уровне концентраций, измеряемых в мкг/л – нг/л. Прибор применяли для количественного определения: 1 – Рb (Свинец), 2 – Cd (Кадмий), 3 – As (Мышьяк) по ГОСТ 30178-96 и ГОСТ Р 51766-2001.

### Результаты исследований и их обсуждения

На первом этапе проведены исследования технологических свойств исследуемых зерновых сортов гречихи. В таблице 1 представлены качественные характеристики сортов гречихи в сравнении со стандартным образцом.

Анализ таблицы 1 позволяет утверждать, что исследуемые зерна гречихи соответствует требованиям ГОСТ 19092-92 «Гречиха. Требования при заготовках и поставках» и может быть использованы для дальнейших исследований и разработки новой технологии.

Далее были проведены исследования химического состава сортов гречихи (таблица 2), для изучения пищевой ценности сырья.

В исследуемых образцах гречихи максимальное содержание углеводов принадлежат сортам «Батыр» и «Шортандинская», что составляет 54,55% и 54,43%. Анализ белка в зерне селекционных сортов гречихи, показал, что более высокие показатели имеет сорт «Шортандинская» (13,04 %), а у сорта «Батыр» массовая доля белка составило 11,67%. Если сравнить полученные результаты с результатами исследований ученых РФ, то в работе С.П.Меренковой, Н.В.Андросовой содержание белка в зернах гречихи составило в пределах 12,3-13,0%, жир 3,1-3,23% и углеводы 58,3-67,8% соответственно [33]. Все показатели соответствуют базисным нормам НД.

**Таблица 1** – Качественные характеристики зерна гречихи в соответствии с требованиями НД

Наименование показателя	Базисная норма по НД	Сорта гречихи		
		«Шортандинская»	«Батыр»	«Саулык»
Заготавливаемая и поставляемая гречиха должна быть в здоровом негнущемся состоянии, иметь свойственные здоровому зерну нормальный цвет, запах (без затхлого, солодового, плесневелого, постороннего запахов)		соответствует	соответствует	соответствует
Влажность, %	14,5	11	12	12,5
Сорная примесь, %	1,0	0,06	0,07	0,07
Зерновая примесь, %	1,0	0,005	0,008	0,01
Зараженность вредителями	не допускается	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено

**Таблица 2** – Химический состав селекционных сортов гречихи

Наименование показателя	Сорт		
	«Шортандинская»	«Батыр»	«Саулык»
Массовая доля углеводов, %	54,43±0,41	54,55±0,41	52,63±0,41
Массовая доля белка, %	13,04±0,18	11,67±0,18	12,45±0,18
Массовая доля жира, %	3,55±0,04	3,21±0,04	3,10±0,04
Пищевая ценность, ккал	303,27	293,77	446,11

Полученные данные свидетельствуют о том, что сорт гречихи «Шортандинская», имеющий высокое содержание белка, в дальнейшем будет использоваться при производстве растительных молочных напитков.

Следующим этапом НИР было изучение показателей безопасности качества сортов гречихи согласно требованиям технического ре-

гламента Таможенного союза «О безопасности зерна» 015/2011. В таблице 3 представлены результаты содержания токсичных элементов в селекционных сортовых образцах гречихи.

Во всех исследуемых образцах гречихи содержание токсичных элементов не обнаружено, что соответствует требованиям нормативных документов.

**Таблица 3** – Определение токсичных элементов в гречихе

Показатели	Допустимые уровни по ТР ТС 015/2011, мг/кг, не более	Сорт		
		«Шортандинская»	«Батыр»	«Саулык»
Кадмий	0,1	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Свинец	0,5	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Мышьяк	0,2	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено

На основании полученных данных можно сделать вывод, что по количественному содержанию углеводов и массовой доли белка лидируют показатели сорта гречихи «Шортандинская». Содержание токсичных элементов в исследуемых образцах находятся в пределах

нормы по ТР ТС 015/2011. Таким образом, отобранный сорт гречихи «Шортандинская» будет использоваться в новой технологии производства зерновых «молочных» напитков, обогащенных Омега-3 полиненасыщенными жирными кислотами.

## Выводы

Таким образом, переработка зернового сырья в растительное молоко, является эффективным способом производства продуктов здорового питания. Химический состав и натуральные биологически активные соединения гречихи с комбинированием других растительных наполнителей в разрабатываемой технологии придат напитки новые полезные свойства.

Производство растительного молока позволит расширить ассортимент экологически чистых продуктов, а также повысить пищевую ценность готового продукта, обогатить его функциональными компонентами, учитывая непереносимость лактозы, повышенную чувствительность к белкам молока определенного слоя населения, в том числе взрослых и детей.

Анализ исследований показателей качества селекционных сортов гречихи показал, что сорта гречихи характеризуются в целом высоким

содержанием белка, жира и углеводов. По результатам исследования отобранный сорт гречихи «Шортландинская» будет использоваться в разработке новой технологии растительного молочного напитка.

## Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликта интересов.

## Источник финансирования

Научно-исследовательская работа выполняется в рамках ПЦФ Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан BR10764970 по теме «Разработка наукоемких технологий глубокой переработки с/х сырья в целях расширения ассортимента и выхода готовой продукции с единицы сырья, а также снижения доли отходов в производстве продукции» на 2021-2023гг.

## Литература

- 1 Granato, D.; Branco, G.F.; Nazzaro, F.; Cruz, A.G.; Faria, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010, 9, 292–302.
- 2 Vijaya Kumar, B.; Vijayendra, S.V.; Reddy, O.V. Trends in dairy and non-dairy probiotic products—A review. *J. Food Sci. Technol.* 2015, 52, 6112–6124.
- 3 Gouw, V.P.; Jung, J.; Zhao, Y. Functional properties, bioactive compounds, and in vitro gastrointestinal digestion study of dried fruit pomace powders as functional food ingredients. *LWT Food Sci. Technol.* 2017, 80, 136–144.
- 4 Rathore, S.; Salmeron, I.; Pandiella, S.S. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiol.* 2012, 30, 239–244.
- 5 Vieira da Silva, B.; Barreira, J.C.M.; Oliveira, M.B.P.P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends Food Sci. Technol.* 2016, 50, 144–158.
- 6 Yasmin, A.; Butt, M.S.; van Baak, M.; Shahid, M.Z. Supplementation of prebiotics to a whey-based beverage reduces the risk of hypercholesterolaemia in rats. *Int. Dairy J.* 2015, 48, 80–84.
- 7 Матвеева И.В., Белявская И.Г. Биотехнологические основы приготвления хлеба. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 150 с.
- 8 Матвеева И.В., Белявская И.Г. Пищевые добавки и хлебобулочные улучшители в производстве мучных изделий. – М.: «Телер», 2001. – 99 с.
- 9 Радионова, А.В. Анализ состояния и перспектив развития российского рынка функциональных напитков. – 2014. – №1. – С. 1–2.
- 10 Будько, Д. Мировой рынок альтернативных молочных продуктов: ожидается стремительный рост / Д. Будько // Бизнес пищевых ингредиентов. Апрель-май 2016 [Текст]. – Режим доступа: [https://novaproduct.ru/ing/articles/non\\_dairy\\_milk/](https://novaproduct.ru/ing/articles/non_dairy_milk/).
- 11 Settaluri, V.S. Peanuts and their nutritional aspects – a review / V.S. Settaluri, C.V.K. Kandala, N. Puppala, J. Sundaram // *Food and Nutrition Sci-ences.* – 2012. – V. 3. – № 12. – P. 1644-1650, doi: 10.4236/fns.2012.312215.
- 12 Sethi, S. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review / S. Sethi, S.K. Tyagi, R.K. Anurag // *Journal of Food Science and Technology.* – 2016. – V. 53. – Iss. 9. – P. 3408–3423, doi:10.1007/s13197-016-2328-3.
- 13 Самофалова, Л.А. Научное обоснование применения прорастающих семян двудольных растений в производстве растительной основы и заменителей молочных продуктов функционального значения: автореф. дисс. ... д-ра техн. наук: 05.18.07 / Л.А. Самофалова. – СПб., 2010 – 32 с.
- 14 Makinen, O.E. Foods for special dietary needs: non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products / O.E. Makinen, V. Wanhalinna, E. Zannini, E.K. Arendt // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* – 2016. – V. 56 (3). – P. 339–49, doi:10.1080/10408398.2012.761950.
- 15 Hambleton, M. Us non-dairy milk market re-port / M. Hambleton [Текст]. – Режимдоступа: // <https://store.mintel.com/US-NON-DAIRY-MILK-MAR-KET-REPORT>.



- 16 Как развивается рынок растительных аналогов молока? // Milknews: Новости и аналитика молочного рынка. – 03.05.2018.
- 17 Wong, V. Soy milk fades as americans opt for drinkable almonds / V. Wong // Business Week. – 22.08.2013.
- 18 Diarra, K. Peanut milk and peanut milk based products production: a review / K. Diarra, G.N. Zhang, J. Chen // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2005. – V. 45 (5). – P. 405–423, doi.org/10.1080/10408390590967685.
- 19 Bastioğlu, A.Z. Spray dried melon seed milk powder: physical, rheological and sensory properties / A.Z. Bastioğlu, D. Tomruk, M. Koç, F.K. Ertekin // Journal of Food Science and Technology. – 2016. – V. 53 (5). – P. 2396–2404, doi.org/10.1007/s13197-016-2214-z.
- 20 Functional and luxury foods market analysis: Market Analysis – Functional Foods // Frost & Sullivan. November 2015.
- 21 Schwan, R.F.; Ramos, C.L. Chapter 10: Functional Beverages from Cereals. In Functional and Medicinal Beverages; Grumezescu, A., Holban, A.M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 351–379.
- 22 Романенко, В.О. Оценка пищевой ценности напитка на основе крахмалсодержащего сырья / В.О. Романенко, В.А. Помозова, К.А. Исылова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. – С. 191.
- 23 Valenzuela H, Smith J. Buckwheat. Sustainable Agriculture Green Manure Crops 2002; 4: 1-3.
- 24 Zhang ZL, Zhou ML, Tang Y, et al. Bioactive compounds in functional buckwheat food. Food Res Int 2012; 49: 389-95.
- 25 Sammut D, Dennison P, Venter C, Kurukulaaratchy RJ. Buckwheat allergy: a potential problem in 21st century Britain. BMJ Case Rep 2011; 2011: 1-3. <http://dx.doi.org/10.1136/bcr.09.2011.4882> PMID: 22674117
- 26 Zhou X, Wen L, Li Z, Zhou Y, Chen Y, Lu Y. Advance on the benefits of bioactive peptides from buckwheat. Phytochem Rev 2015; 14: 1-8.
- 27 Ермолаев, Я.Ю. Инновационная технология киселей на основе гречишного и ячменного крахмала / Я.Ю. Ермолаев, А.А. Сарафанов // Сборник материалов 4-й конференции молодых ученых и специалистов институтов Россельхозакадемии «Научно-инновационные технологии как основа продовольственной безопасности РФ» – 2010. – С. 94–97.
- 28 Sun T, Ho CT. Antioxidant activities of buckwheat extracts. Food Chem 2005; 90: 743-9.
- 29 Tanveer B.P., Bisma M., Inayatullah T., Reiaz U. R. Buckwheat Journey to Functional Food Sector//Current Nutrition & Food Science. 2019. 15. pp.1-8.
- 30 Yang N, Li YM, Zhang K, et al. Hypocholesterolemic activity of buckwheat flour is mediated by increasing sterol excretion and down-regulation of intestinal NPC1L1 and ACAT2. J Funct Foods 2014; 6: 311-8.
- 31 Wieslander G, Fabjan N, Vogrincic M, et al. Eating buckwheat cookies is associated with the reduction in serum levels of myeloperoxidase and cholesterol: a double blind crossover study in daycare centre staffs. Tohoku J Exp Med 2011; 225(2): 123-30. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.225.123> PMID: 21931228
- 32 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011). Введ. в дейст. 01.07.2013.
- 33 С.П. Меренкова. Актуальные аспекты производства напитков на растительном сырье / С.П. Меренкова, Н.В. Андросова // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2018. Т. 6, № 3. С. 57–67.

## References

- 1 Bastioğlu A.Z., Tomruk D., Koç M., F.K. (2016) Ertekin Spray dried melon seed milk powder: physical, rheological and sensory properties. Journal of Food Science and Technology, vol. 53 (5), pp. 2396–2404, doi.org/10.1007/s13197-016-2214-z.
- 2 Bud'ko, D. Mirovoj rynek al'ternativnyh molochnyh produktov: ozhidaetsya stremitel'nyj rost / D. Bud'ko // Biznes pishchevyh ingredientov. Aprel'-maj 2016 [Tekst]. – Rezhim dostupa:
- 3 Diarra K., Zhang G.N., Chen J. (2005) Peanut milk and peanut milk based products production: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 45 (5), pp. 405–423, doi.org/10.1080/10408390590967685.
- 4 Ermolaev, YA.YU. Innovacionnaya tekhnologiya kiselej na osnove grechishnogo i yachmennogo krahmala / YA.YU. Ermolaev, A.A. Sarafanov // Sbornik materialov 4-j konferencii molodyh uchenyh i specialistov institutov Rossel'hozakademii «Nauchno-innovacionnye tekhnologii kak osnova prodovol'stvennoj bezopasnosti RF» – 2010. – S. 94–97.
- 5 Functional and luxury foods market analysis: Market Analysis – Functional Foods // Frost & Sullivan. November 2015.
- 6 Granato D., Branco G.F., Nazzaro F., Cruz A.G., Faria J.A.F. (2010) Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., vol. 9, pp. 292–302.
- 7 Gouw V.P., Jung J., Zhao Y. Functional properties, bioactive compounds, and in vitro gastrointestinal digestion study of dried fruit pomace powders as functional food ingredients. (2017) LWT Food Sci. Technol, vol. 80, pp.136–144.
- 8 Hambleton, M. Us non-dairy milk market re-port / M. Hambleton [Текст]. // <https://store.mintel.com/US-NON-DAIRY-MILK-MAR-KET-REPORT>.
- 9 Kak razvivaetsya rynek rastitel'nyh analogov moloka? // Milknews: Novosti i analitika molochnogo rynka. – 03.05.2018.
- 10 Matveeva I.V., Belyavskaya I.G. Biotekhnologicheskie osnovy prigotovleniya hleba. – M.: DeLi print, 2001. – 150 s.
- 11 Matveeva I.V., Belyavskaya I.G. Pishchevye dobavki i hlebobulochnye uluchshiteli v proizvodstve muchnyh izdelij. – M.: «Teler», 2001. – 99 s.
- 12 Makinen O.E., Wanhalinna V., Zannini E., Arendt E.K. (2016) Foods for special dietary needs: non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. vol. 56 (3), pp. 339–49, doi:10.1080/10408398.2012.761950.
- 13 Radionova, A.V. Analiz sostoyaniya i perspektiv razvitiya rossijskogo rynka funkcional'nyh napitkov. – 2014. – №1. – S. 1 – 2.

- 14 Rathore S., Salmeron I., Pandiella S.S. (2012) Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiol*, vol. 30, pp. 239–244.
- 15 Romanenko, V.O. Ocenka pishchevoj cennosti napitka na osnove krahmalsoderzhashchego syr'ya / B.O. Romanenko, V.A. Pomozova, K.A. Isylova // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. – 2014. – № 5. – S. 191.
- 16 Samofalova, L.A. Nauchnoe obosnovanie primeneniya prorstayushchih semyan dvudol'nyh rastenij v proizvodstve rastitel'noj osnovy i zamenitelej molochnyh produktov funkcional'nogo znacheniya: avtoref. diss. ... d-ra tekhn. nauk: 05.18.07 / L.A. Samofalova. – SPb., 2010 – 32 s.
- 17 Sammut D, Dennison P, Venter C, Kurukulaaratchy RJ. (2011) Buckwheat allergy: a potential problem in 21st century Britain. *BMJ Case Rep*, pp.1-3. <http://dx.doi.org/10.1136/bcr.09.2011.4882> PMID: 22674117
- 18 Schwan R.F. Ramos C.L. (2019) Chapter 10: Functional Beverages from Cereals. In *Functional and Medicinal Beverages*; Grumezescu, A., Holban, A.M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 351–379.
- 19 Settaluri V.S., Kandala C.V.K., Puppala N., Sundaram J. (2012) Peanuts and their nutritional aspects – a review. *Food and Nutrition Sciences*. vol.3.№ 12. pp. 1644-1650, doi: 10.4236/fns.2012.312215.
- 20 Sethi S., Tyagi S.K., Anurag R.K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review, (2016) *Journal of Food Science and Technology*, vol.53. Iss. 9., pp. 3408–3423, doi:10.1007/s13197-016-2328-3.
- 21 Sun T, Ho CT. (2005) activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, vol. 90, pp. 743-9.
- 22 Tanveer B.P., Bisma M., Inayatullah T., Reiaz U. R. (2019) Buckwheat Journey to Functional Food Sector. *Current Nutrition & Food Science*, vol. 15. pp.1-8.
- 23 Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza «O bezopasnosti pishchevoj produkcii» (TR TS 021/2011). Vved. v dejst. 01.07.2013.
- 24 Valenzuela H, Smith J. Buckwheat. (2002) *Sustainable Agriculture Green Manure Crops*, vol. 4, pp. 1-3.
- 25 Vieira da Silva B., Barreira J.C.M., Oliveira M.B.P.P. (2016) Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends Food Sci. Technol.* vol. 50, pp.144–158.
- 26 Vijaya Kumar B., Vijayendra S.V., Reddy O.V. (2015) Trends in dairy and non-dairy probiotic products—A review. *J. Food Sci. Technol*, vol. 52, pp. 6112–6124.
- 27 Wieslander G, Fabjan N, Vogrincic M, et al. Eating buckwheat cookies is associated with the reduction in serum levels of myeloperoxidase and cholesterol: a double blind crossover study in daycare centre staffs. *Tohoku J Exp Med* 2011; 225(2): 123-30. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.225.123> PMID: 21931228
- 28 Wong, V. Soy milk fades as americans opt for drinkable almonds. *Business Week*. – 22.08.2013.
- 29 Yang N, Li YM, Zhang K, et al. (2014) Hypocholesterolemic activity of buckwheat flour is mediated by increasing sterol excretion and down-regulation of intestinal NPC1L1 and ACAT2. *J Funct Foods*, vol. 6, pp. 311-8.
- 30 Yasmin A., Butt M.S., van Baak M., Shahid M.Z. (2015) Supplementation of prebiotics to a whey-based beverage reduces the risk of hypercholesterolaemia in rats. *Int. Dairy J.* Vol. 48, pp. 80–84.
- 31 Zhang ZL, Zhou ML, Tang Y, et al. (2012) Bioactive compounds in functional buckwheat food. *Food Res Int*, vol. 49, pp. 389-95.
- 32 Zhou X, Wen L, Li Z, Zhou Y, Chen Y, Lu Y. (2015) Advance on the benefits of bioactive peptides from buckwheat. *Phytochem Rev*, vol. 14, pp. 1-8.
- 33 S.P.Merenkova. Actual aspects of the production of beverages on vegetable raw materials / S.P.Merenkova, N.V.Androsova // *Vestnik YurGU. Series “Food and Biotechnology”*. 2018. Vol. 6, № 3. pp. 57–67.

3-бөлім  
**МИКРОБИОЛОГИЯ**

---

Section 3  
**MICROBIOLOGY**

---

Раздел 3  
**МИКРОБИОЛОГИЯ**

П.Г. Алексюк\*<sup>ID</sup>, А.П. Богоявленский<sup>ID</sup>, М.С. Алексюк<sup>ID</sup>,  
К.С. Аканова<sup>ID</sup>, Е.С. Молдаханов<sup>ID</sup>, Э.С. Омиртаева<sup>ID</sup>,  
В.Э. Березин<sup>ID</sup>

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии  
и вирусологии», Казахстан, г. Алматы  
\*e-mail: pagenal@bk.ru

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ ЛИЗИРУЮЩИХ КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ *E. COLI*

Нозокомиальные инфекции представляют собой огромную проблему для современного здравоохранения. По данным ВОЗ ежегодно, около десяти миллионов госпитализированных больных погибают или приобретают инвалидность из-за поражения внутрибольничными инфекциями. Одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций являются патогенные штаммы *E. coli*, которые представляют смертельную опасность для пациентов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, у большого количества штаммов *E. coli* развилась устойчивость практически ко всем известным классам антибиотиков, что резко снижает эффективность антибиотикотерапии при борьбе с подобными патогенами. В сложившихся условиях, всё большую актуальность получают исследования по поиску альтернативных методов лечения бактериальных инфекций. К наиболее актуальным и перспективным относят метод фаготерапии.

Целью данных исследований являлось выделение из объектов окружающей среды бактериофагов способных лизировать клинические штаммы *E. coli*, и изучение их биологических свойств.

В результате проведённых исследований было установлено, что объекты окружающей среды, расположенные в санитарно-неблагополучных районах, являются наиболее предпочтительными объектами для выделения литических бактериофагов *E. coli*. Из образцов, отобранных в подобных районах было выделено 6 бактериофагов способных лизировать клинический штамм *E. coli*. Выделенные бактериофаги являлись строго видоспецифичными и обладали максимальной литической активностью в концентрациях  $10^5$  вирусных частиц в мл и более, что является стандартом для коммерческих фаговых препаратов и показывает их высокую антибактериальную активность достаточную для эффективной борьбы с патогенными штаммами бактерий *E. coli*.

**Ключевые слова:** Бактериофаг, *Escherichia coli*, нозокомиальная инфекция, антибиотикоустойчивость, литическая активность.

P.G. Alexyuk\*, A.P. Bogoyavlenskiy, M.S. Alexyuk,  
K.S. Akanova, Y.S. Moldakhanov, E.S. Omirtaeva, V.E. Berezin  
LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology", Kazakhstan, Almaty  
\*e-mail: pagenal@bk.ru

### Isolation and characterization of bacteriophages lysing clinical strains of *E. coli*.

Nosocomial infections are an important problem in modern healthcare. According to the WHO, annually, about ten million hospitalized patients die or become disabled due to nosocomial infections. One of the main causative agents of nosocomial infections are pathogenic strains of *E. coli*, which pose a danger to immunocompromised patients. In addition, a large number of *E. coli* strains have developed resistance to almost all known classes of antibiotics, which dramatically reduces the effectiveness of antibiotic therapy in the fight against such pathogens. Under these conditions, research on development of alternative approaches to combatting bacterial infections is becoming increasingly important. The most relevant and promising method is phage therapy.

The purpose of these studies was to isolate bacteriophages from environmental objects capable of lysing clinical strains of *E. coli*, and to study their biological properties.

As a result of the conducted studies, it was found that environmental objects located in sanitary-unfavorable areas are the most preferable objects for the isolation of *E. coli* lytic bacteriophages. Six bacteriophages able to lyse the clinical strain of *E. coli* were isolated from samples collected in similar areas. The isolated bacteriophages were strictly species-specific and possessed maximum lytic activity at concentrations of  $10^5$  viral particles per ml or more, which is the standard for commercial phage prepa-



rations. The investigated phages showed their high antibacterial activity sufficient to effectively combat against pathogenic of *E. coli* strains.

**Key words:** Bacteriophage, *Escherichia coli*, nosocomial infection, antibiotic resistance, lytic activity.

П.Г. Алексюк\*, А.П. Богоявленский, М.С. Алексюк,  
К.С. Аканова, Е.С. Молдаханов, Э.С. Омиртаева, В.Э. Березин  
Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы «ЖШС, Қазақстан Алматы  
\*e-mail: pagenal@bk.ru

### ***E. coli* клиникалық штамдарын лизидейтін бактериофагтардың бөліп алу және сипаттау**

Нозокомиалды инфекциялар – қазіргі заманғы денсаулық сақтау саласындағы үлкен проблема. ДДҰ мәліметтері бойынша, жыл сайын ауруханаға жатқызылған он миллионға жуық науқас нозокомиалды инфекциялардың салдарынан қайтыс болады немесе мүгедек болып қалады. Нозокомиалды инфекциялардың негізгі қоздырғыштарының бірі *E. coli*, патогенді штамдары – иммунитеті төмен науқастарға өлім қаупін тудыруы мүмкін. Сонымен қатар, көптеген ішек таяқшалары штамдарының антибиотиктердің барлық дерлік кластарына төзімділігі дамыды, бұл осындай патогендермен күресте антибиотикалық терапияның тиімділігін күрт төмендетеді. Бұл жағдайда бактериялық инфекцияны емдеудің баламалы әдістерін іздеу бойынша зерттеулер өзектілігін арттыруда. Ең өзекті және перспективалы әдіс – фаготерапия.

Бұл зерттеулердің мақсаты қоршаған орта объектілерінен *E. coli* клиникалық штамдарын лизиске қабілетті бактериофагтарды бөліп алу және олардың биологиялық қасиеттерін зерттеу болды.

Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде санитарлық-қолайсыз жерлерде орналасқан қоршаған орта нысандары *E. coli* литикалық бактериофагтарын оқшаулау үшін ең қолайлы объектілер болып табылатындығы анықталды. Ұқсас аймақтардан алынған үлгілерден *E. coli* клиникалық штаммын лизиске қабілетті 6 бактериофаг бөлініп алынды. Оқшауланған бактериофагтар қатаң түрде түр-спецификалық болды және бір мл-ге  $10^5$  немесе одан да көп вирустық бөлшектер концентрацияларында максималды литикалық белсенділікке ие болды, бұл коммерциялық фаг препараттары үшін стандарт болып табылады және олардың *E. coli* патогенді штамдарымен тиімді күресуге жеткілікті жоғары бактерияға қарсы белсенділігін көрсетеді.

**Түйін сөздер:** Бактериофаг, *Escherichia coli*, нозокомиалды инфекция, антибиотикке төзімділік, литикалық белсенділік.

### **Сокращения и обозначения**

МПБ – мясопептонный бульон;  
МПА – мясопептонный агар;  
БОЕ – бляшкообразующие единицы;  
ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор.

### **Введение**

Нозокомиальные инфекции являются одной из основных проблем современного здравоохранения. Они присутствуют почти во всех стационарах, наносят значительный вред здоровью пациентов и сотрудников медицинских учреждений, причиняют большой экономический ущерб. По данным ВОЗ ежегодно, во всём мире около десяти миллионов госпитализированных больных погибают или приобретают инвалидность из-за ненадлежащей медицинской практики и поражения внутрибольничными инфекциями. По приблизительным оценкам в развитых странах,

от внутрибольничных инфекций страдает от 5 до 10 % пациентов медицинских учреждений, в развивающихся странах их количество может достигать 25% [1]. Поражение госпитализированных пациентов нозокомиальными инфекциями увеличивает срок их нахождения в стационаре в 2-3 раза, что приводит к повышению стоимости лечения в 3-4 раза и риску летального исхода в 5–7 раз [2]. Прямые финансовые потери от нозокомиальных инфекций, согласно данным ВОЗ, ежегодно составляют примерно 7 миллиардов евро в Европе и 6,5 миллиардов долларов в США [3].

Обострение проблемы нозокомиальных инфекций обусловлено глобальным распространением антибиотикоустойчивости среди микроорганизмов. По заявлению Всемирной организации здравоохранения, многие достижения современной медицины и эпидемиологии в борьбе с инфекционными заболеваниями, сделанные в XX в., могут потерять свою зна-

чимость из-за роста устойчивости бактерий к антибиотикам.

Одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций являются патогенные штаммы *E. coli*.

*E. coli* представляет собой широко распространённые комменсальные грамотрицательные бактерии, обитающие в желудочно-кишечном тракте человека и многих теплокровных животных. Однако среди общей массы безопасных штаммов *E. coli* встречаются патогенные серотипы, которые могут стать причиной развития кишечных инфекций, инфекций мочевыводящих путей, мягких тканей, центральной нервной системы [4]. Ежегодно, по всему миру сотни миллионов людей страдают от заболеваний, вызванных патогенными штаммами *E. coli* [5]. Особую опасность патогенные штаммы *E. coli* представляют для госпитализированных пациентов с ослабленным иммунитетом. Нозокомиальные инфекции кишечной палочки могут привести к развитию острой бактериемии и сепсиса с последующим летальным исходом [6].

Кроме того, в условиях постоянного контакта с человеком, у большого количества штаммов *E. coli* развилась устойчивость практически ко всем известным классам антибиотиков. Повсеместное лечение кишечных инфекций антибиотиками первой линии, такими как котримоксазол, амоксициллин, амоксициллин в комплексе с клавулановой кислотой, выработали у *E. coli* резистентность к данным препаратам [7]. Использование относительно новых классов антибиотиков широкого спектра действия, фторхинолонов и цефалоспоринов, привело к развитию у *E. coli*  $\beta$ -лактамазной активности, что также позволяет ей успешно противостоять данным классам антибиотиков [8].

Ситуацию осложняет то, что на современном этапе развития науки, в направлении поиска и разработки новых антибиотиков, наблюдается снижение активности и сокращение финансирования подобных исследований. Сохранение такой тенденции, в конечном итоге, приведёт к исчерпанию средств для борьбы с устойчивыми бактериальными инфекциями [9].

В подобных условиях, опасность устойчивых нозокомиальных инфекций приобретает угрожающие масштабы и всё большую актуальность получают исследования по поиску альтернативных путей борьбы с ними. Наиболее перспективной альтернативой антибиотикам считаются бактериофаги.

Бактериофаги – это вирусы, поражающие бактерии. Учитывая природу бактериофагов как естественных врагов бактерий, их применение в качестве терапевтических агентов для борьбы с бактериальными инфекциями началось уже через пару лет после их открытия самим Феликсом Д’Эреллем [10]. Но после открытия и внедрения в клинику антибиотиков, интерес к бактериофагам как к средству борьбы с патогенными бактериями резко сократился. Клиническое использование бактериофагов практиковалось в основном только в России, Грузии и Польше [11].

На данный момент, из-за распространения антибиотикорезистентности, интерес к бактериофагам и фаготерапии значительно вырос. Современной науке уже известно большое количество примеров успешного использования бактериофагов для лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций [12-15]. Но учитывая развития устойчивости у бактерий к фаговым инфекциям и высокую специфичность бактериофагов к своим хозяевам, необходимо проводить постоянный поиск и выделение новых, наиболее эффективных в каждом конкретном случае штаммов бактериофагов.

Целью данных исследований являлось выделение из объектов окружающей среды бактериофагов способных лизировать клинические штаммы *E. coli*, и изучение их биологических свойств.

## Материалы и методы

Отбор образцов окружающей среды. Для выделения бактериофагов *E. coli* было отобрано 5 образцов почвы и 5 образцов воды. Образцы почвы были отобраны: 1) на территории пункта сбора товарно-бытовых отходов в микрорайоне Тастак 2, г. Алматы, 2) на территории мусорного полигона находящейся на 36 км автомагистрали Алматы – Капшагай, 3) на территории мусорного полигона г. Капшагай, 4) на берегу озера расположенного в районе аэропорта г. Алматы, 5) на берегу реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы; образцы воды были отобраны: 1) из реки Правый Есентай в районе микрорайона Кемел, г. Алматы, 2) из сбросного коллектора канализационных вод города Шымкент, 3) из накопителей канализационных полей фильтрации города Капшагай, 4) из сточного канал, впадающий в озеро Сорбулак, 5) из озера, расположенное в районе аэропорта г. Алматы.

Отбор образцов почвы и воды проводили в стерильную посуду объёмом 500 мл, отбор проб воды вели на глубине 15-20 см, отбор проб почвы осуществляли с поверхностного слоя глубиной до 10 см. Образцы транспортировали и хранили при температуре 4...8°C в непрозрачной и защищённой от прямых солнечных лучей упаковке.

**Штаммы бактерий.** Для выделения, пассажа бактериофагов и описания их свойств использовали клинический штамм *E. coli* 753, предоставленный АО «Центральная клиническая больница» г. Алматы. Данный штамм *E. coli* обладает лекарственной устойчивостью к пенициллинам, фторхинолонам I-III поколения, триметоприму.

Для изучения специфичности выделенных бактериофагов использовали *Ps. aeruginosa* 153 – штамм, выделенный с поверхности испорченных мясных продуктов и *Bacillus subtilis* – стандартный образец сенной палочки. Данные штаммы были предоставлены коллекцией микроорганизмов «НПЦ микробиологии и вирусологии».

**Питательные среды.** Для культивирования бактерий и пассажей бактериофагов использовали мясопептонный бульон (МПБ) (Nutrient Broth, «Himedia», India). Для хранения бактерий, выделения бактериофагов, определения титра по Грациа и описания морфологии бляшкообразующих единиц (БОЕ) использовали 2% питательный агар (МПА) (Nutrient Agar «Himedia», India).

Для фильтрации отобранных образцов и фаголизатов использовали бумажный фильтр «Красная лента» и мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм Agilent Captiva (Agilent Technologies, USA).

Получение фильтратов почвенных образцов. 50 г образца почвы заливали 500 мл стерильного фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (ФСБ), далее комки почвы тщательно измельчали до получения как можно более однородной суспензии и ставили на качалку на 6 часов. Через 6 часов суспензию почвы фильтровали через бумажный фильтр «Красная лента», затем, для инактивации патогенных микроорганизмов в полученный фильтрат добавляли хлороформ до концентрации 0,1% и выдерживали в течение 24 часов при температуре 4...8°C. Далее образцы фильтровали через бумажный фильтр и через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Образцы хранили стерильно в тёмном месте при температуре 4...8°C [16].

Получение фильтратов водных образцов. Для инактивации патогенных микроорганизмов

в водные образцы добавляли хлороформ до концентрации 0,1% и выдерживали в течение 24 часов при температуре 4...8°C. Водный образец фильтровали через бумажный фильтр и через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Образцы хранили стерильно в тёмном месте при температуре 4...8°C [17].

ДНК из полученных фильтратов выделяли с помощью набора для экстракции PureLinkViralDNA/RNAMiniKit («Invitrogen», USA) по протоколу фирмы-производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) согласно инструкции, для флуориметра Qubit 2,0. Анализ качества геномных библиотек проводили на приборе Agilent 2100, при использовании прилагаемых чипов согласно инструкции производителя [18].

Метагеномный анализ отобранных образцов проводили методом множественного параллельного секвенирования при использовании прибора Illumina MiSeq [19]. Контроль качества полученных ридов был выполнен с помощью программы Fast QC. Затем полученные данные были обработаны в Trimmomatic v. 0.36, последовательности короче 50 нуклеотидов были исключены из анализа; адаптеры были удалены. После удаления некачественных считываний и обрезки адаптеров последовательности были проанализированы программой Kaiju с использованием базы данных не избыточных белков: бактерий, архей, вирусов, грибов и микробных эукариот (NCBI BLAST nr + euk) с параметрами по умолчанию [20]. Графическое представление полученных результатов проводилось с помощью программы «Krona». Анализ предсказанных генов проведен с помощью онлайн – сервера «MG-RAST» [21].

Культивирование используемых штаммов бактерий проводили в МПБ в течение 24 часов при 37°C. МПБ готовили в соответствии с инструкцией производителя [22].

Проверка бактериальных культур на наличие лизогенных бактериофагов. Чашки Петри с подготовленным 2% питательным агаром засеивали сплошным газоном 24 часовой бактериальной культурой. Через 18 часов инкубации при 37°C фиксировали рост сплошного газона бактерий с отсутствием каких-либо зон лизиса, после чего открытые чашки Петри облучали ультрафиолетом в течение 10 минут на расстоянии 10 см. Облучённые бактерии смывали 10 мл питательного бульона и культивировали 2 часа при 37°C, за-

тем в бактериальную суспензию добавляли 500 мкл хлороформа (50 мкл на 1 мл суспензии), встряхивали, после чего откручивали 10 минут при 6000 об/мин [23]. Наличие бактериофагов в полученном надосадке определяли методом Отто.

Определение наличия бактериофагов методом Отто. Расплавленный 2 % питательный агар разливали по стерильным чашкам Петри, охлаждали, подсушивали в термостате 10-15 мин. Сплошным газом засеивали на чашки 24 ч культуру бактерий. Наносили каплю образца ближе к одной из сторон чашки, затем чашку наклоняли и давали капле стечь до противоположного края чашки. Чашки инкубировали при 37°C в течение 12 ч после чего фиксировали результат. Если в образце содержался бактериофаг, то по пути стекания капли образца формировалась зона лизиса [24].

Обогащение бактериофагами фильтратов, полученных от образцов окружающей среды. К 45 мкл подготовленного фильтрата добавляли 5 мл 10-кратного МПБ, 5 мл суспензии индикаторных бактерий находящихся в лаг-фазе роста и 100 мкл  $MgSO_4$ . Для обеспечения инфицированности бактерий вирусами и репродукции новых дочерних вирусных частиц смесь культивировали в течении 18 – 24 ч при 37°C с аэрацией. Далее полученный фаголизат центрифугировали в течение 30 мин при 3000 об/мин. Супернатант отфильтровывали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Очищенные фаголизаты, хранили в стерильных условиях при 4...8°C [25]. Наличие фага в фильтрате определяют методом Отто [24].

Выделение бактериофагов на твёрдой питательной среде. Очищенный от бактерий фаголизат 10-кратно титровали до получения девяти разведений. Каждое разведение объёмом 1 мл смешивали с 14 мл 2% питательного агара и добавляли 1 мл 24 часовой культуры индикаторных бактерий. Полученную смесь заливали в чашки Петри и инкубировали в течении 18 часов при 37°C. В качестве контроля использовали ту же смесь, но вместо водного образца добавляли 1 мл стерильного фосфатного буфера. По истечению срока инкубации визуально фиксировали формирование отдельных БОЕ на сплошном газоне бактериальной культуры.

Выделение чистых линий бактериофагов. После обнаружения БОЕ на сплошном газоне бактериальной культуры выбирали отдельно стоящую зону лизиса при максимальном разведе-

дении фаголизата, вырезали её стерильным шпателем или микробиологической петлёй и помещали в стерильную пробирку. В ту же пробирку добавляли 5 мл стерильного питательного бульона, и инкубировали в шейкер-термостате при 37°C и 100 об/мин. Через 2 часа инкубации весь питательный бульон из пробирки, в стерильных условиях пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и добавляли 100 мкл 24 часовой культуры индикаторных бактерий. Полученную смесь культивировали 18 часов при 37°C, после чего центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин и пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Далее из полученной фаголизата отбирали 100 мкл и проводили девять 10-кратных разведений в 900 мкл стерильного ФСБ. Каждое разведение смешивали с 14 мл 2% питательного агара и 1 мл 24 часовой культуры индикаторных бактерий, заливали в чашки Петри и культивировали 18 часов при 37°C. После культивирования фиксировали БОЕ при максимальном разведении, вырезали отдельно стоящую зону лизиса и повторно проводили посев фага по вышеописанной методике. Для получения чистой линии бактериофага последовательно проводили три пассажа каждый раз вырезая отдельно стоящую зону лизиса при максимальном разведении.

Накопительный пассаж бактериофагов. В стерильные 50-ти мл пробирки разливали по 40 мл стерильного МПБ, далее добавляли 500 мкл фаголизата пассируемого бактериофага и 5 мл суточной культуры бактерий-хозяев. Культивирование проводили в течении 24 часа при 37 °C. После культивирования, полученные фаголизаты последовательно очищали центрифугированием в течении 30 минут при 6000 об/мин и фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Фаголизаты хранили в стерильных условиях при температуре 4...8° C [26].

Определение литической активности полученных фаголизатов проводили методом Аппельмана [27].

Титр бактериофага в суспензии определяли методами Грация [28].

## Результаты исследований и их обсуждение

### *Метагеномный анализ образцов окружающей среды на наличие бактериофагов*

По классификации, бактериофаги, поражающие *E. coli* в основном относятся к трём семействам порядка *Caudovirales*: *Myoviridae*, *Podoviridae*

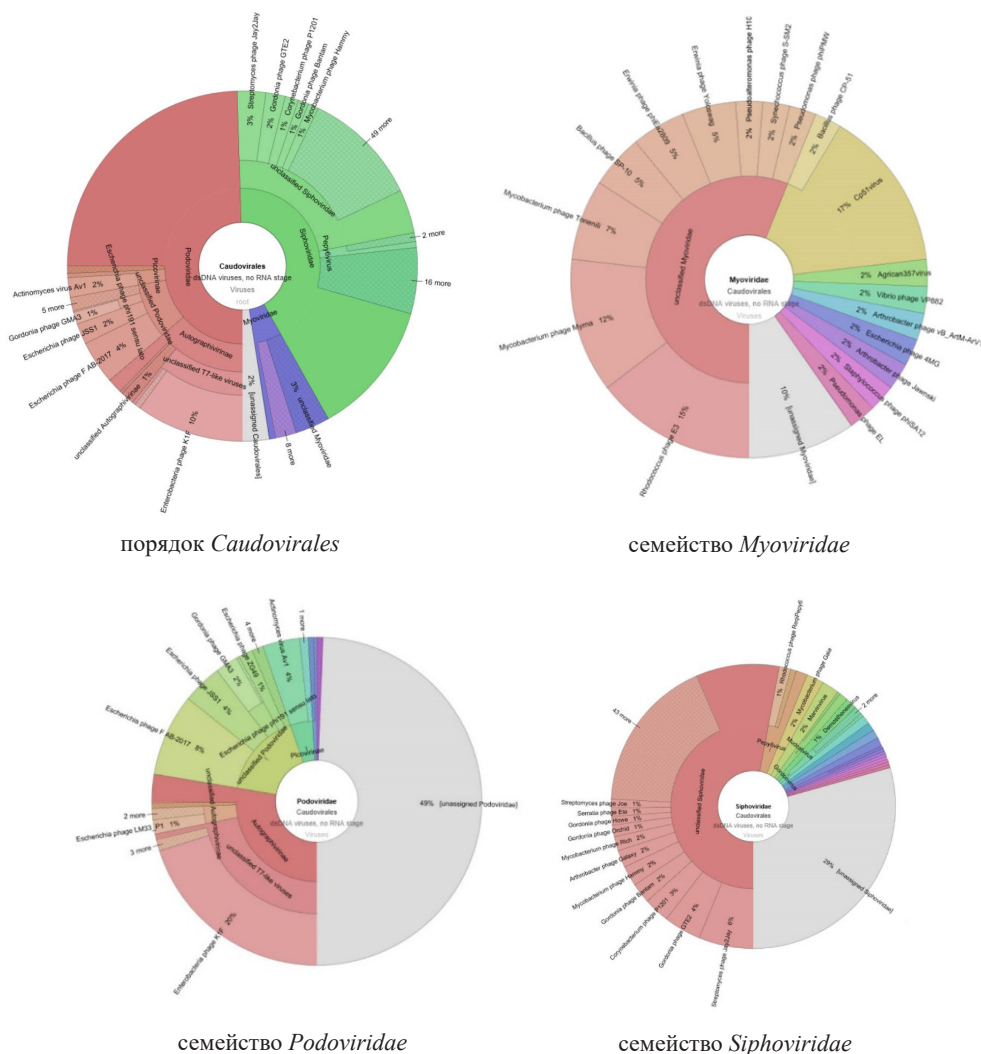


*viridae* и *Siphoviridae*. Для оценки возможности выделения литических бактериофагов *E. coli* из объектов окружающей среды был проведён метагеномный анализ на наличие вирусов порядка *Caudovirales* в двух модельных образцах: образец почвы – почва с берега реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы; образец воды – вода, отобранная с канализационных полей фильтрации города Капшагай. Данные объекты были выбраны в следствии их неблагоприятного санитарного состояния, что значительно повышает вероятность выделения литических бактериофагов *E. coli*.

После секвенирования тотальной нуклеиновой кислоты, выделенной из почвы с берега реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы и последующего метагеномного ана-

лиза было установлено, что в данном образце порядок *Caudovirales* на 50% был представлен семейством *Podoviridae*, на 45% – семейством *Siphoviridae*, на 3% – семейством *Myoviridae* и 2% – не классифицируемые вирусы порядка *Caudovirales* (Рисунок 1).

Метагеномный анализ каждого семейства бактериофагов из почвенного образца позволил идентифицировать нуклеотидные последовательности 10 бактериофагов *Podoviridae*, 15 бактериофагов *Siphoviridae* и 18 бактериофагов *Myoviridae*. При этом 49% всех нуклеотидных последовательностей семейства *Podoviridae*, 29% нуклеотидных последовательностей семейства *Siphoviridae* и 10% нуклеотидных последовательностей семейства *Myoviridae* были не классифицированы.



**Рисунок 1** – Метагеномный анализ образца почвы на наличие бактериофагов порядка *Caudovirales*, семейств *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*

Секвенирование и метагеномный анализ тотальной нуклеиновой кислоты водного образца с канализационных полей фильтрации города Капшагай, показал, что порядок *Caudovirales*, в данном случае, на 55% представлен семейством *Myoviridae*, на 25% – семейством *Siphoviridae*, на 18% – семейством *Podoviridae* и 2% – не классифицируемые вирусы порядка *Caudovirales*

(Рисунок 2). Анализ нуклеотидных последовательностей каждого из представленных семейств позволил идентифицировать 16 бактериофагов семейства *Myoviridae*, 9 бактериофагов семейства *Siphoviridae* и 9 бактериофагов семейства *Podoviridae*. Не удалось классифицировать 2% нуклеотидных последовательностей семейства *Podoviridae*, 8% – *Siphoviridae* и 6% – *Myoviridae*.

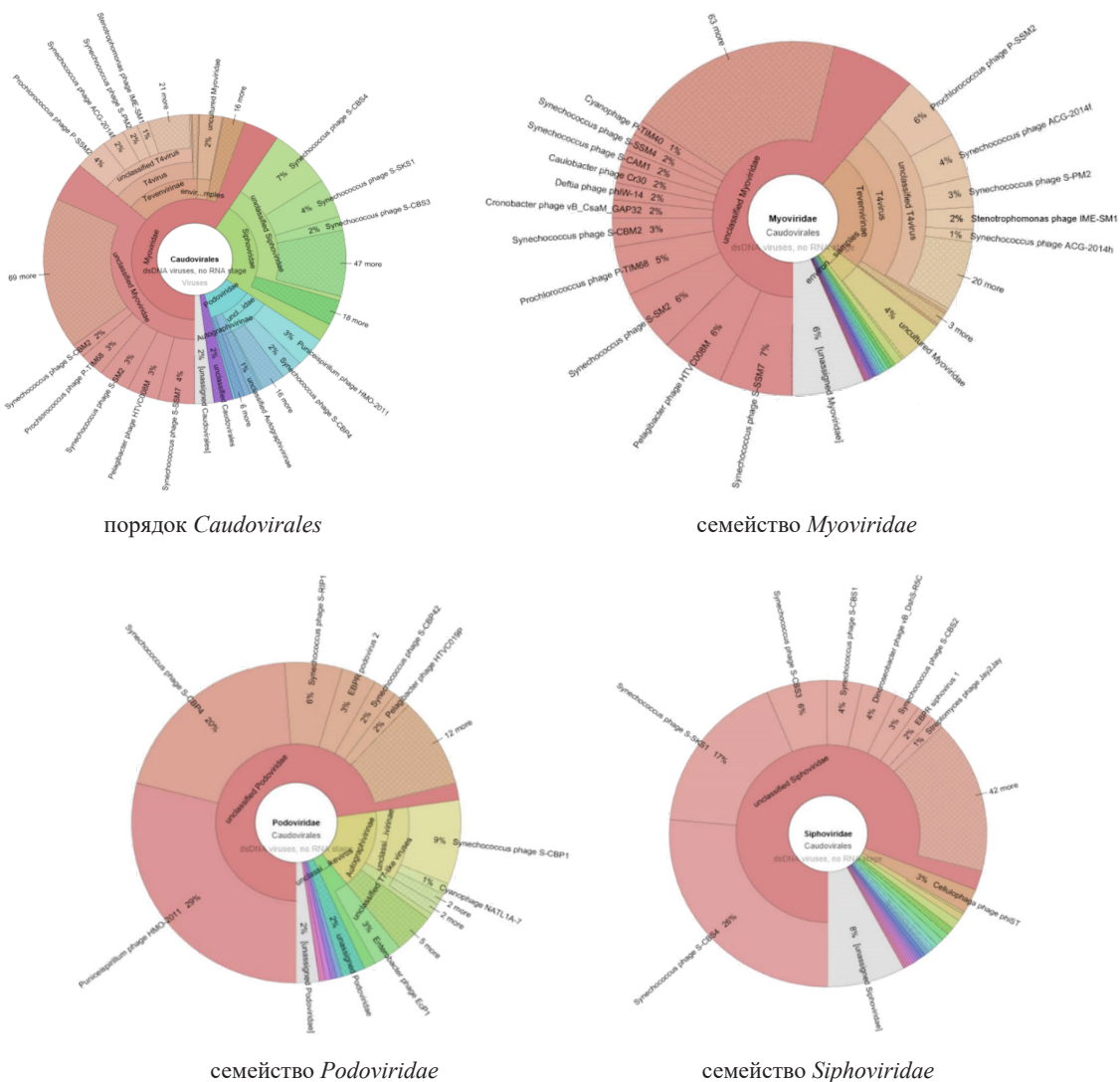


Рисунок 2 – Метагеномный анализ образца воды на наличие бактериофагов порядка *Caudovirales*, семейств *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что в отобранных образцах содержится широкое разнообразие бактериофагов порядка *Caudovirales* относящихся к семействам *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*. В почвенном образце с берега реки

Правый Есентай и водном образце с канализационных полей фильтрации г. Капшагай в общем удалось идентифицировать наличие нуклеотидных последовательностей 43 и 34 штаммов бактериофагов порядка *Caudovirales*, соответственно. При этом во всех случаях есть доля (от 2% до

49%) неклассифицированных последовательно-стей, относящихся ко всем трём семействам порядка *Caudovirales*, что может дать возможность по выделению и определению новых штаммов бактериофагов.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой вероятности выделения литических бактериофагов *E. coli* из образцов окружающей среды отобранных в санитарно-неблагополучных районах.

#### *Выделение литических бактериофагов E. coli*

Для выделения литических бактериофагов *E. coli* было отобрано 10 образцов из санитарно-неблагополучных объектов окружающей среды. 5 образцов почвы: 1) на территории пункта сбора товарно-бытовых отходов в микрорайоне Тастак 2, г. Алматы, 2) на территории мусорного полигона находящейся на 36 км автомагистрали Алматы – Капшагай, 3) на территории мусорного полигона г. Капшагай, 4) на берегу озера расположенного в районе аэропорта г. Алматы, 5) на берегу реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы. 5 образцов воды: 1) из реки Правый Есентай в районе микрорайона Кемел, г. Алматы, 2) из сбросного коллектора канализационных вод города Шымкент, 3) из накопителей канализационных полей фильтрации города Капшагай, 4) из сточного канал, впадающий в озеро Сорбулак, 5) из озера, расположенное в районе аэропорта г. Алматы.

Из отобранных образцов были получены фильтраты. Методом капельного теста (метод Отто) все полученные фильтраты были проверены на наличие в них бактериофагов способных лизировать *E. coli*.

Литические бактериофаги *E. coli* были обнаружены в 1 почвенном образце – почва с берега реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы, и 4 водных образцах: 1) образец из реки Правый Есентай в районе микрорайона Кемел, г. Алматы, 2) образец из сбросного коллектора канализационных вод города Шымкент, 3) образец из накопителей канализационных полей фильтрации города Капшагай, 4) образец из сточного канал, впадающий в озеро Сорбулак.

Методом последовательных селективных пассажей было выделено 6 чистых линий бактериофагов способных лизировать *E. coli*. В соответствии с источником выделения и бактерией хозяином фаги получили название ECPS-1, ECPR-1, ECS-1, ECFFK-1, ECScS-1, ECScS-2.

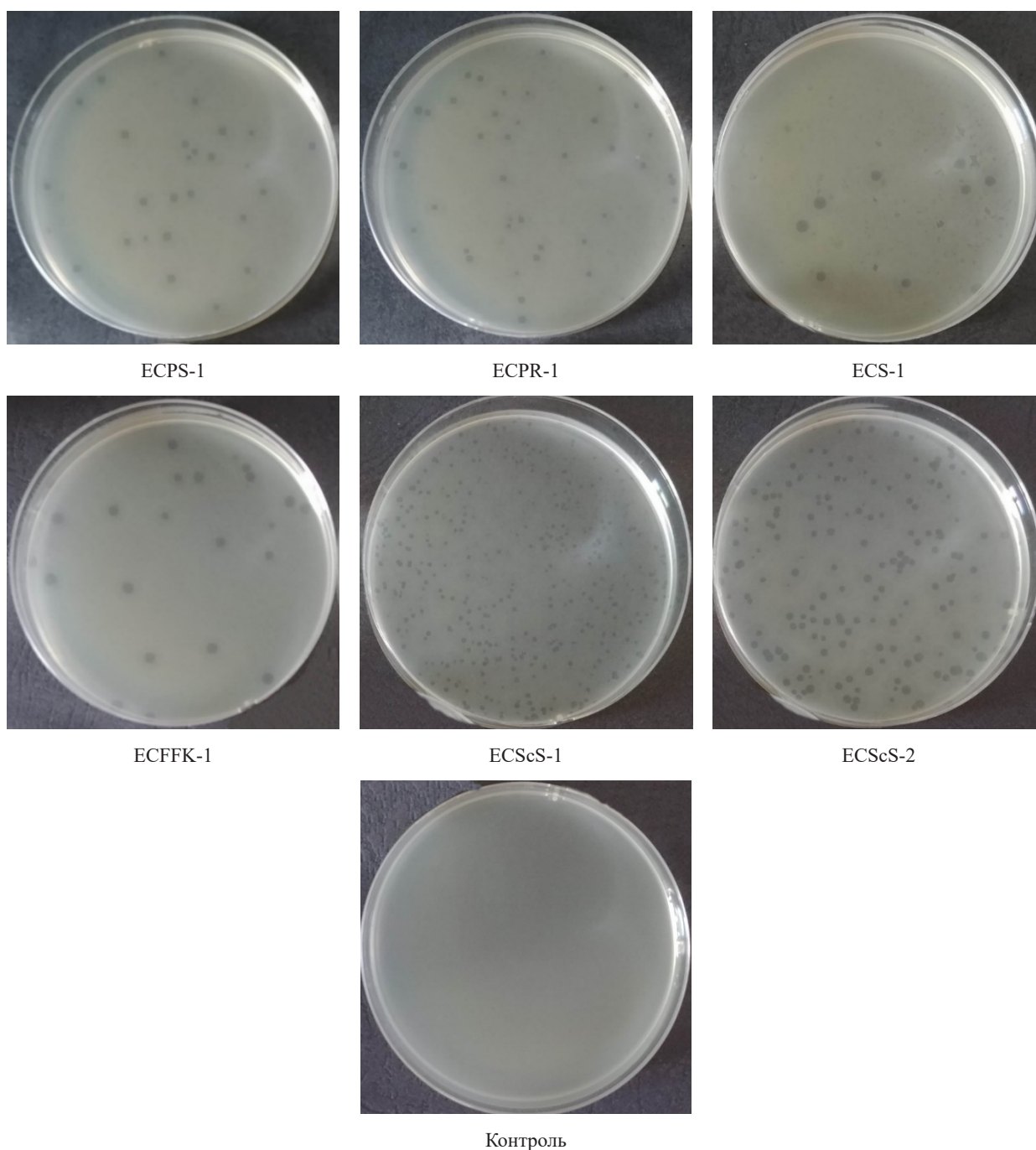
#### *Характеристика выделенных бактериофагов*

Выделенные фаги исследовали по свойствам, имеющим таксономическое значение: 1) морфологии БОЕ; 2) литической активности и 3) специфичности.

Морфологию БОЕ изучали при посеве на питательный агар совместно с индикаторными бактериями *E. coli* (Таблица 1, Рисунок 3).

**Таблица 1** – Описание выделенных бактериофагов

Условное наименование бактериофага	Описание морфотипа негативной колонии	Место выделения бактериофага	Индикаторная культура бактерий
ECPS-1	Прозрачная колония диаметром $\approx 2,4$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 7 мм.	Почва с берега реки Правый Есентай в районе мкр. Первомайский, г. Алматы	<i>E. coli</i>
ECPR-1	Прозрачная колония диаметром $\approx 2,1$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 6 мм.	Вода из реки Правый Есентай в районе мкр. Первомайский, г. Алматы	<i>E. coli</i>
ECS-1	Прозрачная колония диаметром $\approx 4$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 8 мм.	Канализационные воды г. Шымкент	<i>E. coli</i>
ECFFK-1	Прозрачная колония диаметром $\approx 3$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 7 мм.	Вода с канализационных полей фильтрации г. Капшагай	<i>E. coli</i>
ECScS-1	Прозрачная колония диаметром $\approx 1,5$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 5 мм.	Вода из сточного канала, впадающего в озеро Сорбулак	<i>E. coli</i>
ECScS-2	Прозрачная колония диаметром $\approx 2$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 6 мм.	Вода из сточного канала, впадающего в озеро Сорбулак	<i>E. coli</i>



**Рисунок 3** – Зоны лизиса, сформированные выделенными бактериофагами *E. coli*

Было установлено, что все выделенные бактериофаги формируют БОЕ равной округлой формы диаметром от 1,5 до 4 мм и с зоной неполного лизиса от 5 до 8 мм. Так же было показано, что каждый выделенный бактериофаг формирует скопление БОЕ одинакового морфотипа, в среднем с одинаковым диаметром и зоной не-

полного лизиса, что подтверждает чистоту линии выделенных фагов.

Уровень литической активности выделенных бактериофагов определяли по методу Аппельмана, титр определяли по методу Грациа.

Было показано (Таблица 2), что все выделенные бактериофаги обладали уровнем литиче-



ской активности от  $10^{-6}$  до  $10^{-8}$  и имели высокий титр вирусных частиц –  $10^8$  –  $10^9$  на 1 мл.

При производстве коммерческих фаговых препаратов стандартной дозой считается  $10^5$  вирусных частиц на 1 мл с литической активностью по Аппельману от  $10^{-5}$ . Концентрация и литическая активность, выделенных в данной работе бактериофагов, на порядок и более превышает стандартную, поэтому выделенные бак-

териофаги могут быть использованы при разработке новых, эффективных антибактериальных препаратов, предназначенных для борьбы с нозокомиальными инфекциями.

Специфичность выделенных бактериофагов определяли при их совместном посеве на питательный агар с бактериями *E. coli* 753, *Ps. aeruginosa* 153 и *Bacillus subtilis*, после чего визуально фиксировали формирование зон лизиса (Таблица 3).

**Таблица 2** – Титр и литическая активность выделенных бактериофагов

Штамм бактериофага	Титр по Грациа	Литическая активность по Аппельману
ECPS-1	$2,7 \pm 0,1 \times 10^8$	$10^{-6}$
ECPR-1	$4,2 \pm 0,1 \times 10^8$	$10^{-7}$
ECS-1	$9 \pm 0,3 \times 10^9$	$10^{-8}$
ECFFK-1	$2,2 \pm 0,1 \times 10^6$	$10^{-6}$
ECScS-1	$3,4 \pm 0,1 \times 10^8$	$10^{-8}$
ECScS-2	$1,7 \pm 0,08 \times 10^8$	$10^{-7}$

**Таблица 3** – Литическая активность бактериофагов

Фаг	Литическая активность		
	<i>E. coli</i> 753	<i>Ps. aeruginosa</i> 153	<i>Bacillus subtilis</i>
ECPS-1	+	-	-
ECPR-1	+	-	-
ECS-1	+	-	-
ECFFK-1	+	-	-
ECScS-1	+	-	-
ECScS-2	+	-	-

\*- + – наличие зон лизиса; -

В результате было показано, что выделенные бактериофаги обладали литической активностью только по отношению к клиническому штамму *E. coli* 753. Следовательно, данные бактериофаги представляют собой чистые линии узкоспецифические штаммы колифагов и при лечении инфекций вызванных патогенными *E. coli* полезная микрофлора страдать не будет.

### Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что объекты окружающей

среды, расположенные в санитарно-неблагополучных районах, обладают широким разнообразием бактериофагов порядка *Caudovirales* и являются наиболее предпочтительными объектами для выделения литических бактериофагов *E. coli*.

На основании полученных данных было отобрано по 5 образцов почвы и воды из санитарно-неблагополучных районов. Из отобранных образцов было выделено 6 бактериофагов способных лизировать клинический штамм *E. coli*.

При изучении литической активности и специфичности было установлено, что все вы-

деленные бактериофаги являлись строго видоспецифичными и обладали максимальной литической активностью в концентрациях  $10^5$  вирусных частиц в мл и более, что является стандартом для коммерческих фаговых препаратов и показывает их высокую антибактериальную активность достаточную для эффективной борьбы с патогенными штаммами бактерий *E. coli*.

Полученные результаты дают все основания для возможного использования выделенных бактериофагов *E. coli* в разработке новых высокоэффективных антибактериальных препаратов против антибиотикоустойчивых нозокомиальных инфекций *E. coli*.

### Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

### Источник финансирования

Работа выполнена по теме проекта AP08855753 «Изучение фагоспецифической индукции иммунного ответа как фактора антимикробной терапии» выполняемому в рамках Договора от 12 ноября 2020 года №214 на реализацию научных, научно-технических проектов по грантовому финансированию (2020-2022гг.).

### Литература

- 1 World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. – Geneva: WHO, 2018. – 86 p. <https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/6-june-18108-world-health-statistics-2018.pdf>
- 2 Madden G.R., Weinstein R.A., Sifri C.D. Diagnostic Stewardship for Healthcare-Associated Infections: Opportunities and Challenges to Safely Reduce Test Use // *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* – 2018. – Vol. 39, N 2. – P. 214-218. doi: 10.1017/ice.2017.278.
- 3 Divatia J.V., Pulinilkunnathil J.G., Myatra S.N. Nosocomial Infections and Ventilator-Associated Pneumonia in Cancer Patients // *Oncologic Critical Care.* – 2019. – Vol. 9. – P. 1419–39. doi: 10.1007/978-3-319-74588-6\_125.
- 4 Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity // *Nat Rev Microbiol.* – 2010. – Vol. 8(1). – P. 26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265
- 5 Nicolas-Chanoine M. H., Bertrand X., Madec, J. Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group // *Clinical microbiology reviews.* – 2014. – Vol. 27(3). – P. 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13
- 6 Russo T.A., Johnson J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an overlook epidemic // *Microbes Infect.* – 2003. – Vol. 5. – P. 449–456. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00049-2
- 7 Gupta K., Scholes D., Stamm W.E. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women // *JAMA.* – 1999. – Vol. 281. – P. 736–738. doi: 10.1001/jama.281.8.736
- 8 Coque T.M., Baquero F., Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe // *Euro Surveill.* – 2008. – Vol. 13(47). – pii=19044.
- 9 Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. Volume XXII. – Geneva: WHO, 2014. – 232 p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
- 10 Chanishvili N. Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches // *Adv. Virus Res.* – 2012. – Vol. 83. – P. 3-40. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
- 11 Salmund G.P., Fineran P.C. A century of the phage: Past, present and future // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2015. – Vol. 13. – P. 777–786. doi: 10.1038/nrmicro3564.
- 12 Dedrick R.M., Guerrero-Bustamante C.A., Garlena R.A., Russell D.A., Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Soothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F., Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* // *Nat Med.* – 2019. – Vol. 25(5). – P. 730-733. doi: 10.1038/s41591-019-0437-z.
- 13 Gordillo Altamirano F. L., Barr, J. J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era // *Clinical microbiology reviews.* – 2019. – Vol. 32(2). – e00066-18. doi: /10.1128/CMR.00066-18.
- 14 Chang R., Wallin M., Lin Y., Leung S., Wang H., Morales S., Chan H. K. Phage therapy for respiratory infections // *Advanced drug delivery reviews.* – 2018. – Vol. 133. – P. 76–86. doi: 10.1016/j.addr.2018.08.001.
- 15 Zhvania P., Hoyle N. S., Nadareishvili L., Nizharadze D., Kutateladze M. Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome // *Frontiers in medicine.* – 2017. – Vol. 4. – P. 94. doi: 10.3389/fmed.2017.00094.
- 16 Cross T., Schoff C., Chudoff D., Graves L., Broomell H., Terry K., Farina J., Correa A., Shade D., Dunbar D. An optimized enrichment technique for the isolation of *Arthrobacter* bacteriophage species from soil sample isolates // *J. Vis. Exp.* – 2015. – Vol 9, N98. –e52781. doi: 10.3791/52781.
- 17 Zaczek-Moczyłowska M.A., Young G.K., Trudgett J., Plahe C., Fleming C.C., Campbell K., O' Hanlon R. Phage cocktail containing Podoviridae and Myoviridae bacteriophages inhibits the growth of *Pectobacterium* spp. under in vitro and in vivo conditions // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, N4. – e0230842. doi: 10.1371/journal.pone.0230842.

- 18 Radpour R., Sikora M., Grussenmeyer T., Kohler C., Barekati Z., Holzgreve W., Lefkovits I., Zhong X.Y. Simultaneous isolation of DNA, RNA, and proteins for genetic, epigenetic, transcriptomic, and proteomic analysis // *J. Proteome. Res.* – 2009. – Vol. 8, N11. – P. 5264 – 5274. doi: 10.1021/pr900591w.
- 19 Tucker T., Marra M., Friedman, J. M. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine // *Am. J. Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 85, N2. – P. 142–154. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.06.022.
- 20 Breitwieser F.P., Lu J., Salzberg S.L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly // *Briefings in Bioinformatics.* – 2017. – Vol. 20. – P. 1125-1136. doi: 10.1093/bib/bbx120.
- 21 Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes // *BMC Bioinformatics.* – 2008. – Vol. 9. – P. 386. doi: 10.1186/1471-2105-9-386.
- 22 Mokszycki M.E., Leatham-Jensen M., Steffensen J.L., Zhang Y., Krogfelt K.A., Caldwell M.E., Conway T., Cohen P.S. A Simple In Vitro Gut Model for Studying the Interaction between *Escherichia coli* and the Intestinal Commensal Microbiota in Cecal Mucus // *Appl. Environ Microbiol.* – 2018. – Vol. 84, N24. – e02166-18. doi: 10.1128/AEM.02166-18.
- 23 Berenstein D. Prophage induction by ultraviolet light in *Acinetobacter calcoaceticus* // *J. Gen. Microbiol.* – 1986. – Vol. 132, N9. – P. 2633-2636. doi: 10.1099/00221287-132-9-2633. PMID: 3794658.
- 24 Chhibber S., Kaur P., Gondil V.S. Simple drop cast method for enumeration of bacteriophages // *J Virol Methods.* – 2018. – Vol. 262. – P. 1-5. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.09.001.
- 25 Van Twest R, Kropinski A.M. Bacteriophage enrichment from water and soil // *Methods Mol Biol.* – 2009. – Vol. 501. P. 15-21. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6\_2.
- 26 Tan C.W., Rukayadi Y., Hasan H., Abdul-Mutalib N.A., Jambari N.N., Hara H., Thung T.Y., Lee E., Radu S. Isolation and Characterization of Six *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Bacteriophages From Seafood Samples // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 10. – e616548. doi: 10.3389/fmicb.2021.616548.
- 27 Burrowes B.H., Molineux I.J., Fralick, J.A. Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: the Appelmans protocol // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11. 241. doi: 10.3390/v11030241
- 28 Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 501. – P. 69 – 76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6\_7.

## References

- 1 Breitwieser F.P., Lu J., Salzberg S.L. (2017) A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics.*, vol. 20., pp. 1125-1136. doi: 10.1093/bib/bbx120.
- 2 Berenstein D. (1986) Prophage induction by ultraviolet light in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.*, vol. 132, no 9, pp. 2633-2636. doi: 10.1099/00221287-132-9-2633. PMID: 3794658.
- 3 Burrowes B.H., Molineux I.J., Fralick, J.A. (2019) Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: the Appelmans protocol. *Viruses*, vol. 11, pp. 241. doi: 10.3390/v11030241
- 4 Chang R., Wallin M., Lin Y., Leung S., Wang H., Morales S., Chan H. K. (2018) Phage therapy for respiratory infections. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 133, pp. 76–86. doi: 10.1016/j.addr.2018.08.001.
- 5 Chanishvili N. (2012) Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv. Virus Res.*, vol. 83, pp. 3-40. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
- 6 Chhibber S., Kaur P., Gondil V.S. (2018) Simple drop cast method for enumeration of bacteriophages. *J. Virol. Methods*, vol. 262, pp. 1-5. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.09.001.
- 7 Coque T.M., Baquero F., Canton R. (2008) Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.*, vol. 13, no47, pii. 19044.
- 8 Cross T., Schoff C., Chudoff D., Graves L., Broomell H., Terry K., Farina J., Correa A., Shade D., Dunbar D. (2015) An optimized enrichment technique for the isolation of *Arthrobacter* bacteriophage species from soil sample isolates. *J. Vis. Exp.* vol 9, no 98, e52781. doi: 10.3791/52781.
- 9 Croxen M.A., Finlay B.B. (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no 1, pp. 26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265
- 10 Dedrick R.M., Guerrero-Bustamante C.A., Garlena R.A., Russell D.A., Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Soothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F., Spencer H. (2019) Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Med.*, vol. 25, no 5, pp. 730-733. doi: 10.1038/s41591-019-0437-z.
- 11 Divatia J.V., Pulinilkunnathil J.G., Myatra S.N. (2019) Nosocomial Infections and Ventilator-Associated Pneumonia in Cancer Patients. *Oncologic Critical Care*, vol. 9, pp. 1419–39. doi: 10.1007/978-3-319-74588-6\_125.
- 12 Gordillo Altamirano F. L., Barr, J. J. (2019) Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical microbiology reviews*, vol. 32, no 2, e00066-18. doi: /10.1128/CMR.00066-18.
- 13 Gupta K., Scholes D., Stamm W.E. (1999) Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *JAMA*, vol. 281, pp. 736–738. doi: 10.1001/jama.281.8.736.
- 14 Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. (2009) Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.*, vol. 501, pp. 69 – 76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6\_7.
- 15 Madden G.R., Weinstein R.A., Sifri C.D. (2018) Diagnostic Stewardship for Healthcare-Associated Infections: Opportunities and Challenges to Safely Reduce Test Use. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, vol. 39, no. 2, pp. 214-218. doi: 10.1017/ice.2017.278.

- 16 Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. (2008) The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, vol. 9, pp. 386. doi: 10.1186/1471-2105-9-386.
- 17 Mokszycki M.E., Leatham-Jensen M., Steffensen J.L., Zhang Y., Krogfelt K.A., Caldwell M.E., Conway T., Cohen P.S. (2018) A Simple In Vitro Gut Model for Studying the Interaction between *Escherichia coli* and the Intestinal Commensal Microbiota in Cecal Mucus. *Appl. Environ Microbiol.*, vol. 84, no. 24, e02166-18. doi: 10.1128/AEM.02166-18.
- 18 Nicolas-Chanoine M. H., Bertrand X., Madec, J. Y. (2014) *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical microbiology reviews*, vol. 27, no 3, pp. 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13.
- 19 Radpour R., Sikora M., Grussenmeyer T., Kohler C., Barekati Z., Holzgreve W., Lefkovits I., Zhong X.Y. (2009) Simultaneous isolation of DNA, RNA, and proteins for genetic, epigenetic, transcriptomic, and proteomic analysis. *J. Proteome Res.*, vol. 8, no.11. pp. 5264 – 5274. doi: 10.1021/pr900591w.
- 20 Russo T.A., Johnson J.R. (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an overlook epidemic. *Microbes Infect.*, vol. 5, pp. 449–456. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00049-2.
- 21 Salmond G.P., Fineran P.C. (2015) A century of the phage: Past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, pp. 777–786. doi: 10.1038/nrmicro3564.
- 22 Tan C.W., Rukayadi Y., Hasan H., Abdul-Mutalib N.A., Jambari N.N., Hara H., Thung T.Y., Lee E., Radu S. (2021) Isolation and Characterization of Six *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Bacteriophages From Seafood Samples. *Front. Microbiol.*, vol. 10, e616548. doi: 10.3389/fmicb.2021.616548.
- 23 Tucker T., Marra M., Friedman, J. M. (2009) Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 85, no. 2, pp. 142–154. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.06.022.
- 24 Van Twest R, Kropinski A.M. (2009) Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol. Biol.*, vol. 501, pp. 15-21. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6\_2.
- 25 World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Volume XXII. – Geneva: WHO, 2014. – 232 p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>.
- 26 World Health Organization. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. – Geneva: WHO, 2018. – 86 p. <https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/6-june-18108-world-health-statistics-2018.pdf>
- 27 Zaczek-Moczyłowska M.A., Young G.K., Trudgett J., Plahe C., Fleming C.C., Campbell K., O' Hanlon R. (2020) Phage cocktail containing Podoviridae and Myoviridae bacteriophages inhibits the growth of *Pectobacterium* spp. under in vitro and in vivo conditions. *PLoS One*, vol. 15, no. 4, e0230842. doi: 10.1371/journal.pone.0230842.
- 28 Zhvania P., Hoyle N. S., Nadareishvili L., Nizharadze D., Kutateladze M. (2017) Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome. *Frontiers in medicine*, vol. 4, pp. 94. doi: 10.3389/fmed.2017.00094.



**Е.В. Кухар\*** , **В.С. Киян** 

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Казахстан, г. Нур-Султан

\*e-mail: kucharev@mail.ru

## **БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНАМОРФЫ И ТЕЛЕОМОРФЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНТЕРДИГИТАЛЬНОЙ ТРИХОФИТИИ ЧЕЛОВЕКА**

В статье представлены результаты выделения антропофильных штаммов дерматомицетов и анализа их биологических свойств: культуральных, морфологических, биохимических. Проведена фенотипическая и генетическая идентификация штаммов. Установлено, что штамм гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5, выделенный из кожи и пораженного ногтя пациента, отличался полиморфизмом культуральных признаков и разнообразием морфологических микроструктур. Штамм гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9, выделенный с кожи очага поражения межпальцевой складки ног, имел более стабильные культурально-морфологические признаки. Анализ биохимических свойств позволил выявить наличие сахаролитической и уреазной активности.

При первичном выделении культуры антропофильные штаммы фенотипически достоверно являлись штаммами *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*. Длительное хранение культур методом субкультивирования привело к появлению морфологически разнородных колоний штаммов, что выражалось в появлении выраженной морщинистости, заметных радиальных борозд и зональных колец, мощного ветвления в субстрат и его разрывов, изменения цвета колонии, смены пигментации реверзума.

В результате молекулярно-генетической идентификации штамма методом анализа ITS региона в BLAST, выявлено, что культуры являются телеоморфой дерматомицета *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, известной как *Arthroderma vanbreuseghemii* со 100%-ной достоверностью.

**Ключевые слова:** анаморфа, телеоморфа, возбудители дерматомикозов, антропофильные дерматомицеты, интердигитальная трихофития, артроспоры, мицелий, микроконидии, макроконидии

Ye.V. Kukhar \*, V.S. Kiyani

S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Kazakhstan, Nur-Sultan

\*e-mail: kucharev@mail.ru

### **Biological properties of anamorphe and teleomorphe of the causing agent of human interdigital trichophythy**

The article presents the results of isolation of anthropophilic strains of dermatomycetes and analysis of their biological properties. The biological properties of dermatomycetes were studied: cultural, morphological, biochemical, phenotypic and genetic identification of strains was carried out. It has been established that the *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* No. 5 isolated from the patient's skin and affected nail was distinguished by polymorphism of cultural characters and a variety of morphological microstructures. The fungus strain *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* No. 9 isolated from the skin of the lesion of the interdigital folds of the legs had more stable cultural and morphological characteristics. Analysis of biochemical properties revealed the presence of saccharolytic and urease activity.

At the initial isolation of the culture, the anthropophilic strains were phenotypically reliably the strains of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*. Long-term storage of cultures by subculturing has led to the appearance of morphologically heterogeneous colonies of strains which was expressed in the appearance of pronounced wrinkling, noticeable radial grooves and zonal rings, powerful branching into the substrate and its breaks, changes in the color of the colony, changes in the pigmentation of the reverzum.

As a result of the molecular genetics identification of the strain strain by analysis of the ITS region in BLAST, it was revealed that the cultures are a teleomorph of the dermatomycete *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* known as *Arthroderma vanbreuseghemii* with 100% confidence.

**Key words:** anamorph, teleomorph, pathogens of dermatomycosis, anthropophilic dermatomycetes, interdigital trichophytosis, arthrospores, mycelium, microconidia, macroconidia

Е.В. Кухар\*, В.С. Киян

С. Сейфуллин ат.Қазақ агротехникалық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

\*e-mail: kucharev@mail.ru

### Адамның интердигиталды трихофитиясы қоздырушысының анаморфтық және телеоморфтық биологиялық қасиеттері

Мақалада дерматомицеттердің антропофильдік штамдарын бөліп алу мен олардың биологиялық қасиеттерінің: өсінділік, морфологиялық, биохимиялық талдау нәтижелері келтірілген. Штамдардың фенотиптік және генетикалық идентификациялау жұмыстары жүргізілген. Зерттеу барысында №5 *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* саңырауқұлағымен зақымдалған науқастың терісі мен тырнағынан бөлініп алынған штаммының өсінділік қасиеттерінің полиморфизм танытатыны және морфологиялық микроқұрылымдарының алуан түрлі сипат білдіретіні анықталды. Ал, саусақаралық қатпар терісінен бөлініп алынған №9 *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* саңырауқұлағы штаммының өсінділік-морфологиялық белгілері тұрақтырақ болды. Биохимиялық қасиеттерін талдау арқылы сахаролитикалық және уреазалық белсенділік білдіретіні анықталды.

Өсінділердің біріншілік бөлініп алынуы кезінде антропофильдік штамдар фенотиптік тұрғыдан нақты *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* штамдары болып шықты. Субкультивациялау әдісімен өсінділерді ұзақ сақтаған кезде штамдардың морфологиялық әртекті колониялары пайда болатыны анықталған. Әртекті колониялар келесі белгілермен сипатталған: қатпарлардың пайда болуы, айқын радиалды ойықтардың пайда болуы, зоналық сақиналардың пайда болуы, колониялардың субстратқа тармақталуы, колония түсінің өзгеруі және реверзум пигментациясының өзгеруі.

Штаммды BLAST әдісін қолдана отырып ITS аумағын молекулалық-генетикалық идентификациялау нәтижесінде өсінділердің *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* дерматомицетінің телеоформасы болып табылатыны анықталды, олар 100% *Arthroderma vanbreuseghemii* штаммы екені белгілі.

**Түйін сөздер:** анаморфа, телеоморфа, дерматомикоз қоздырушылары, антропофильдік дерматомицеттер, интердигиталды трихофития, артроспоралар, мицелилер, микроконидилер, макроконидилер

## Введение

Грибы, вызывающие поражения кожи у животных и человека, называют дерматомицетами (дерматофитами), они широко распространены в природе. Дерматофиты родов *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* паразитируют только на кератинизированных слоях кожи и ее придатках, поэтому патология носит название дерматомикозы.

Дерматомицеты долгое время относились к несовершенным грибам – *Fungi imperfecti* (дейтеромицеты, несовершенные грибы), которые являются условным, формальным классом грибов, объединяющим грибы, не имеющие полового размножения, образующие септированный мицелий, размножающиеся только бесполом путем в результате формирования конидий [1]. Дерматомицеты являются многоклеточными бесхлорофильными эукариотическими, грамположительными микроорганизмами с клеточной стенкой, образуют ветвящиеся тонкие нити (гифы), сплетающиеся в грибницу, или мицелий. Гифы дерматомицетов разделены перегородками, или септами с отверстиями.

Известно, что размножение грибов происходит половым и бесполом путями. Половое размножение грибов происходит с образованием гамет, половых спор и других половых форм, которые называются *телеоморфами*. Бесполое, вегетативное размножение грибов происходит с образованием соответствующих форм, называемых *анаморфами*. Такое размножение происходит почкованием, фрагментацией гиф и бесполом спорами. На первых этапах изучения у возбудителей дерматомикозов не было выявлено полового пути размножения и наличия половой формы. В то же время у дерматомицетов было установлено наличие большого разнообразия формирующихся конидий, так называемый плеоморфизм.

Экзогенные споры (конидии) формируются на кончиках плодоносящих гиф – конидиеносцах. Основные типы конидий у дерматомицетов: артроконидии (артроспоры), образуются путем равномерного септирования и расчленения гиф. Чаще всего это происходит на стареющих гифах воздушного мицелия. Это связано с тем, что эволюционно так сложилось, что растущие над поверхностью субстрата – воздушные или ре-

продуктивные гифы отвечают за бесполое размножение. Одноклеточные небольшие конидии называются микроконидиями. Они могут быть округлыми, булавовидными или иметь другую морфологическую форму. Большое количество микроконидий обычно образуют дерматофиты рода *Trichophyton*. Многоклеточные, большие конидии называются макроконидиями. Они чаще встречаются у представителей рода *Microsporum*, а также у разных вариантов гриба *Trichophyton mentagrophytes*, имеют характерную форму и служат основным критерием морфологической идентификации.

К бесполом формам грибов относят также хламидоконидии, или хламидоспоры (толстостенные клетки или комплекс мелких клеток) – покоящиеся органы грибов, способствующие их выживанию в неблагоприятных условиях. Для дерматомицетов характерно образование интеркалярных и терминальных хламидоспор, т.е. расположенных, соответственно, в середине или на конце мицелиальной нити [2].

Анаморфа или несовершенная стадия – это стадия бесполого или вегетативного размножения дерматомицетов. Она отличается морфологически и кариологически от совершенной (половой) стадии – телеоморфы. Анаморфы и телеоморфы грибов исторически описывались как самостоятельные виды. Это привело к накоплению огромного количества видов у разных родов грибов. Сегодня молекулярные методы позволяют обнаружить описанные дважды виды [3].

В настоящее время благодаря развитию и совершенствованию методов молекулярной биологии выявлено наличие совершенной стадии у многих несовершенных грибов класса *Fungi imperfecti*, что внесло диссонанс в номенклатуру Царства грибов и привело к изменению их систематики и классификации. Известно, что у аскомицетов, в зависимости от условий организм может переходить в телеоморфу, а может – и нет, в результате чего часто один и тот же аскомицет описывался как два разных вида. Например, название *Aspergillus fisheri* дано анаморфе, телеоморфа которой описана, как *Neosartoria fisheri*. Аналогичная ситуация с *Amorphotheca resinae* и многими другими [4].

Установлено наличие совершенных форм и для дерматомицетов рода *Trichophyton*, к примеру, *Trichophyton mentagrophytes*. Как известно, он имеет две основные разновидности: а) var. *gypseum* (мучнистый) и б) var. *interdigitale* (пу-

шистый). Для обеих разновидностей установлены совершенные формы гриба *Arthroderma benhamiae* и *A. vanbreuseghemii* [5].

Ряд авторов акцентирует внимание на том, что чаще телеоморфы у дерматомицетов выявляются для штаммов, паразитирующих на животных, т.е. для зоофильных штаммов. Так, например, эпидемиологически *Trichophyton mentagrophytes* разделен на две различные формы: зоофильную и антропофильную. Зоофильные изоляты *T. mentagrophytes*, как правило, идентифицируют путем исследования морфологических и биохимических свойств, а также с помощью экспериментов по спариванию. Подтвержденными телеоморфами зоофильных изолятов комплекса *T. mentagrophytes* являются *Arthroderma benhamiae*, *A. simii* и *A. vanbreuseghemii* [6].

В сообщении о случае семейной инфекции, спровоцированной заражением от кроликов с кроликофермы, первоначально возбудителем была названа анаформа зоофильного дерматомицета *Trichophyton mentagrophytes*. Морфологические и биохимические характеристики подтвердили, что инфекция у ребенка и его родителей была вызвана зоофильными *T. mentagrophytes*. Однако, секвенирование продуктов транскрипирования *ITS1/ITS4*, амплифицированных из первичных изолятов культуры, в полимеразной цепной реакции, установило происхождение культуры как *Arthroderma vanbreuseghemii*. Анализ методом RAPD-ДНК показал, что эти изоляты могут быть одним и тем же штаммом [7].

Описан аналогичный случай вспышки дерматофитоза в ветеринарной школе в Берне (Швейцария), который был вызван совершенной формой интердигитального трихофитона *Arthroderma vanbreuseghemii* (формально *Trichophyton mentagrophytes pro parte*). Достоверность идентификации возбудителя была подтверждена фенотипическими характеристиками и последовательностью *ITS* дерматофитов [8].

Сообщается о совершенной форме *Arthroderma benhamiae*, которая также является телеоморфой *Trichophyton mentagrophytes*. В попытке понять эпидемиологические особенности *Trichophyton mentagrophytes* японскими учеными впервые выявлены специфические гены спаривания типа (-) – *alpha-box* и типа (+) – ДНК-связывающего домена с высокой подвижностью (*HMG*) у зоофильных дерматофитов *Arthroderma benhamiae* [9].

*Trichophyton mentagrophytes* считается видовым комплексом, состоящим из нескольких

штаммов, которые включают как антропофилов, так и зоофилов. Точное различие их между собой имеет решающее значение для всестороннего понимания клинических и эпидемиологических последствий генетической гетерогенности этого комплекса. Типирование молекулярных штаммов обеспечивает эффективный способ идентификации каждого штамма. Поэтому для клинических изолятов *T. mentagrophytes* очень важна не только классическая культурально-морфологическая характеристика до уровня подвидов, но также и генетическая с использованием молекулярных методов [10].

Цель исследования – фенотипическая и генетическая идентификация возбудителей интердигитальной трихофитии человека и сравнительная характеристика биологических свойств совершенной и несовершенной формы возбудителей интердигитальной трихофитии *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

### Материалы и методика исследований

Для первичного выделения возбудителя были отобраны 2 пробы биоматериала от анонимных добровольцев – пациентов наркологического диспансера г. Астана с клиническими признаками межпальцевой трихофитии.

Проба 1 (2007 г.) – соскоб кожи в межпальцевом пространстве между третьим и четвертым пальцами левой ноги женщины. Клинически заболевание проявлялось в поражении ногтевой пластинки 4 пальца левой ноги (рыхлая, белесая, утолщенная) и межпальцевого пространства между 2-3 и 3-4 пальцами, наличии зуда, красноты, отслоения кожи.

Проба 2 (2012 г.) – соскоб кожи ниже большого пальца правой ноги человека с покраснением, зудом и мокнутием (кусочки кожи). Поражение кожи стопы клинически проявлялось в виде очага шелушения под большим пальцем, ороговения кожи и нескольких гнойных пузырьков на ступне, наличия зуда и покраснения.

Проведен анализ биологических свойств первичной культуры штаммов, выделенных из биоматериала, изучены биологические свойства дерматомицета: культуральные, морфологические, биохимические.

Поверхностное культивирование для выделения чистой культуры и изучения культурально-морфологических свойств проводили при температуре 28°C на агаровых средах: Сабуро, Чапека, медовой, кукурузной, картофельной –

до завершения формирования характерных колоний. Культурально-морфологическую характеристику дерматомицетов выявляли при росте штаммов на чашках Петри и агаровых блоках по Кадену. Микроскопию культуры гриба проводили в скотч-препаратах, нативных и окрашенных мазках через 24-48-72 и более часов роста в световом микроскопе при увеличении  $\times 40$  и  $\times 400$ . Идентификацию проводили с использованием определителя *Deanna A. Sutton et al.* (2001) [11].

Биохимические свойства изучали на средах Гисса с глюкозой, лактозой, маннозой, маннитом, сахарозой (сахаролитическая активность), среде Кристенсена с 40%-ой мочевиной (уреазная активность), на волосах (кератинолитическая активность).

Наработку биомассы для выделения ДНК проводили на бульоне Сабуро. Определение нуклеотидной последовательности целевых генов дерматомицетов проводили методом ПЦР по паре праймеров *ITS4-ITS5*, затем пробы ДНК очищали для секвенирования. После расшифровки ДНК, результаты вносили в базу данных на сайте [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com). Полученные последовательности были идентифицированы в *GeneBank* по алгоритму *BLAST*.

Идентификация последовательностей осуществлялась относительно инвентарных номеров *GeneBank* первых трех нуклеотидных последовательностей, имеющих максимальное совпадение. Реакцию секвенирования проводили с применением *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе *3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems)* [12].

### Результаты исследования и их обсуждение

Штаммы антропофильного гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, полученные нами при первичном выделении из биоматериала (проба 1 и 2), культивировали на агаре Сабуро при 28°C в присутствии антибиотиков. Рост культур двух штаммов гриба отмечали в месте посева в виде плотной, четко обозначенной точки белого цвета диаметром 0,2-0,3 см на третьи-четвертые сутки. Штамму, выделенному из пробы 1, присвоен внутренний коллекционный номер №5; штамму, выделенному из пробы 2, соответственно, номер №9.

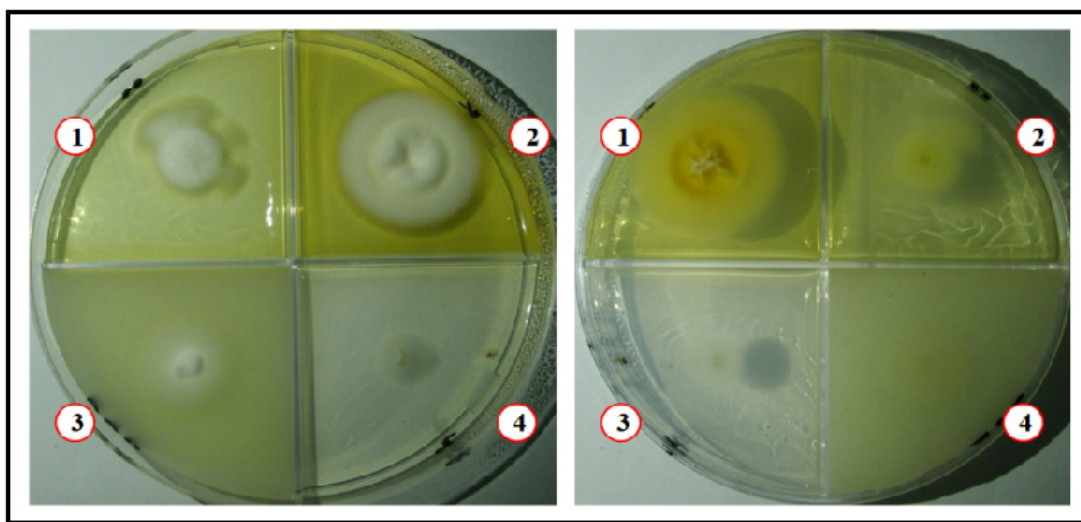
Завершение формирования колонии отмечали на 25-30-е сутки (рисунок 1).





При изменении состава питательных сред в последующих пересевах культура штаммов гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* отличалась постоянством культурально-морфологических свойств. На питательных средах с различными источниками углеводов: картофельный (1), медовый (2), кукурузный (3), Чапека (4)

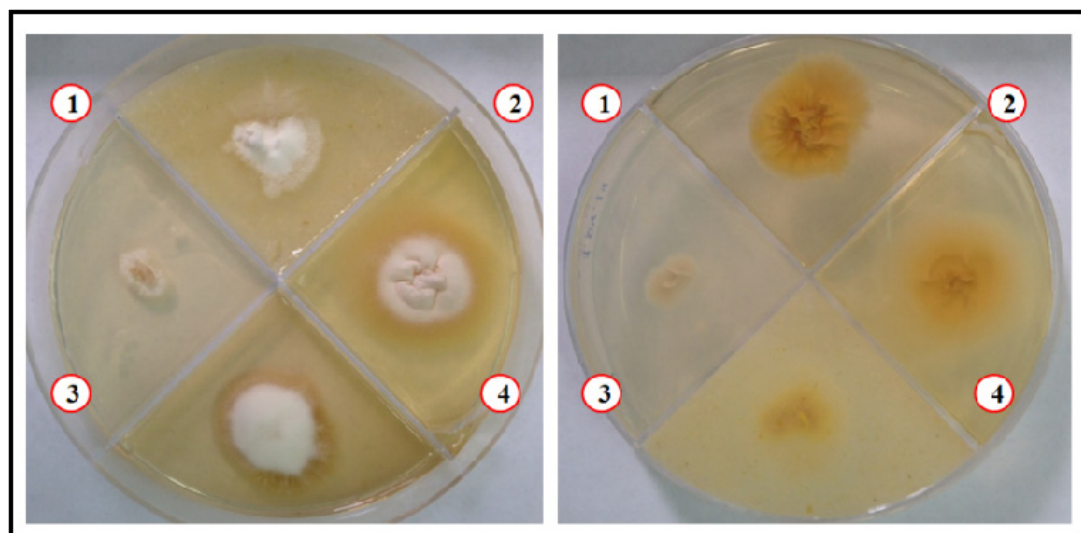
(4) культуры имели белый цвет, хорошо заметные зоны роста поверхностного и глубинного мицелия, практически одинаковую окраску реверзума на всех средах. Штамм №5 имел выраженный соломенно-желтый пигмент обратной стороны колонии (рисунок 3), штамм №9 – песочный (рисунок 4).



а

б

**Рисунок 3** – Характер роста колоний *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 на картофельной (1), медовой (2), кукурузной (3) средах и агаре Чапека (4) (а – лицевая сторона, б – обратная сторона колонии)



а

б

**Рисунок 4** – Характер роста колоний *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9 на картофельной (1), медовой (2), кукурузной (3) средах и агаре Чапека (4): (а – лицевая сторона, б – обратная сторона колонии)

Как видно из рисунка 4, грибы активно накапливали биомассу на медовой среде, слабее – на картофельном и кукурузном агарах.

Диаметр колоний дерматомицетов, сформированных на агаре Чапека был наименьшим, хотя мы связываем это с низкой концентрацией белка и высокой концентрацией солей в составе данного субстрата.

Сравнительный анализ ферментативной активности штаммов показал, что культивирование *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* на агаровых средах с различными источниками углеводов позволяет культурам усваивать их все, хотя скорость утилизации разная. Активнее усваивается фруктоза, затем – глюкоза, слабее – мальтоза и крахмал.

Несмотря на то, что оба штамма относятся к одному виду *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*,

их ферментативная активность отличалась разнообразием.

Сахаролитическая активность в отношении глюкозы явно выражена у обоих штаммов, также как и уреазная активность.

Остальные сахара штаммы расщепляют избирательно: штамм №9 сбраживает лактозу, штамм №5 – все сахара, кроме лактозы (таблица 1).

Микроскопия мазков при первичном культивировании штаммов позволила выявить характерные морфологические структуры *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (рисунок 5).

На рисунке 5 указаны: прозрачный септированный прямой и извитой мицелий (а, г), формирование ростовых трубок (б), завитки (в, г), терминальные хламидоспоры (а), микроконидии (а, д, е) и макроконидии (д).

Таблица 1 – Ферментативные свойства штаммов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*

№ штамма	Среды Гисса с сахарами					Среда Кристенсена	Контроль
	сахароза	маннит	глюкоза	мальтоза	лактоза	мочевина	
№5	++	+	++	+++	–	++	–
№9	–	–	++	–	++	+++	+

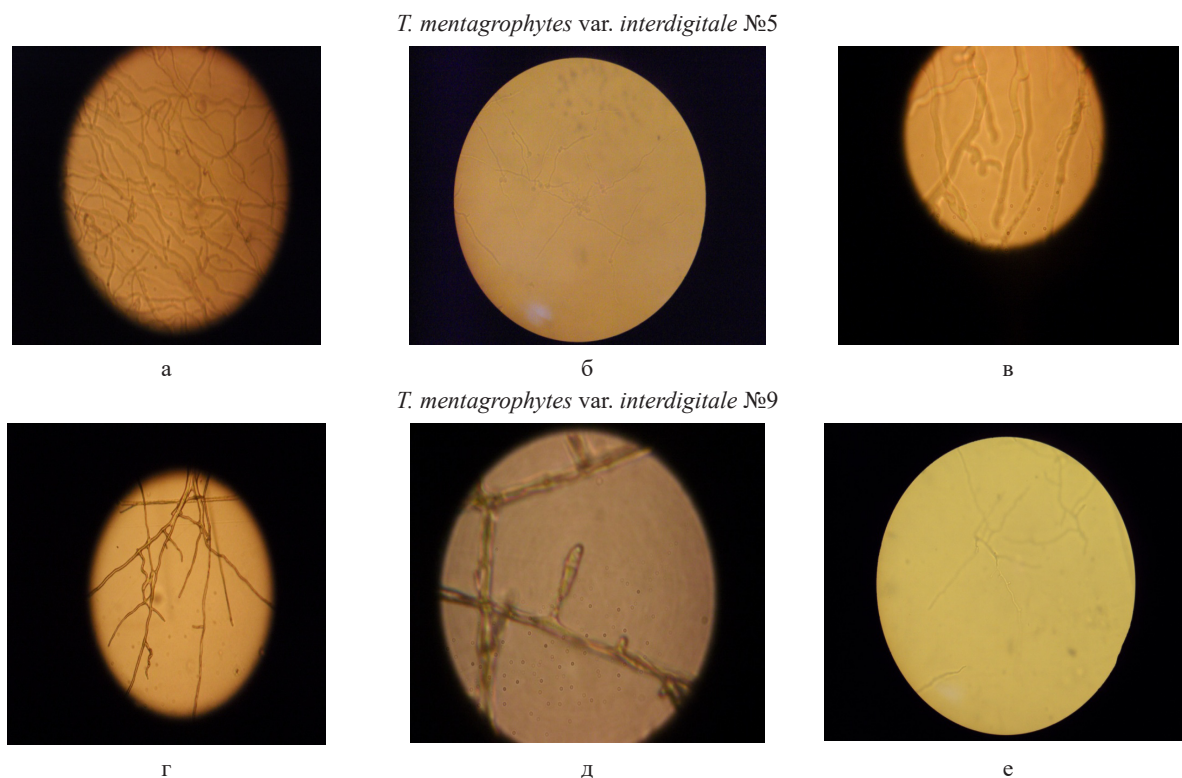


Рисунок 5 – Характерные морфологические структуры *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, агар Сабуро, 28° С, 6 суток, агаровые блоки по Кадену



Анализ биологических свойств после хранения методом субкультивирования в течении 7-10 лет выявил проявление полиморфизма колоний

данных штаммов, что выражалось в довольно резком изменении культуральных свойств (рисунок 6).

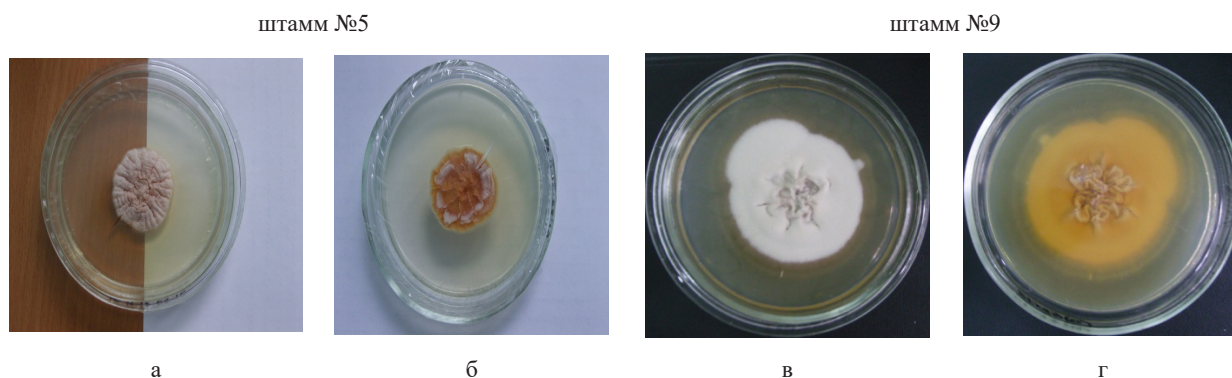


Рисунок 6 – Сформированные колонии штаммов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* на агаре Сабуро: а, в – лицевая сторона, б, г – обратная сторона

У штамма дерматомицета *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 (д, е) отмечалось появление выраженной морщинистости, заметных радиальных борозд и зональных колец, мощного ветвления в субстрат с прорастанием мицелия до самого дна чашек Петри, разрывов питательного субстрата, изменения цвета колонии с белого на розовый, смены пигментации реверзума от песочного до бежево-коричневого. Колонии формировались на 20-25 сутки, диаметр 3,5-4,0, который практически не менялся при дальнейшем культивировании.

Колония *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9 (ж, и) имела менее выраженную полиморф-

ность культуральных свойств. Форма колонии внешне напоминала первично выделенную колонию, цвет лицевой стороны колонии оставался белым, сохранилась выраженная очаговая морщинистость. Цвет пигмента реверзума изменился от коричневого до оранжевого. Диаметр зрелой колонии увеличился: зона поверхностного роста имела размеры 5,3×6,1 см, общий диаметр с учетом зоны глубинного роста был равен 6,8×7,5.

Микроскопия культур дерматомицетов позволила выявить наличие морфологических особенностей, ранее не встречавшихся в культурах *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (рисунок 9).

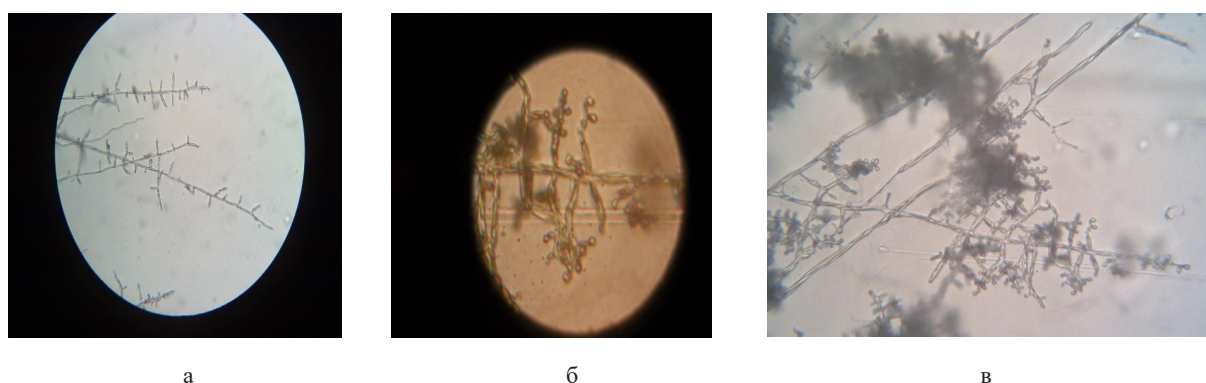


Рисунок 7 – Морфологические структуры штаммов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, агар Сабуро, 28 °С, агаровые блоки, 6 сутки



Как видно из рисунка 7, бесцветные септированные гифы дерматомицетов стали более утолщенными (б), боковые гифы расположены чаще супротивно (а, б). Мицелий ровный, гифы без завитков и спиралей. Появились гроздевидные скопления практически шаровидных алейроспор, их число стало большим (в). Наблюдали наличие большого количества тонких булавовидных макроконидий с многочисленными перегородками (а).

Для решения проблемы контаминации при длительном хранении штаммов продуцентов была проведена генетическая идентификация

описанных штаммов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

В результате идентификации грибов методом анализа *ITS* региона в *BLAST* получено 100% подтверждение того, что обе выделенные нами культуры дерматомицетов принадлежит роду *Arthroderma*, виду *vanbreuseghemii*. В то же время со 100% подтверждением тем же количеством последовательностей было установлено, что эти же штаммы являются дерматомицетами рода *Trichophyton* вида *mentagrophytes* разновидности (variant) *interdigitale* (таблица 2).

**Таблица 2** – Результаты идентификации дерматомицетов вида *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* методом анализа *ITS* региона в *BLAST*

№ культуры	Идентификация нуклеотидных последовательностей в международной базе данных ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ) алгоритм BLAST							
	Инвентарный номер GeneBank (Accession number) или коллекционный номер штамма	Максимальный балл	Наименование штамма	% совпадения	Инвентарный номер GeneBank (Accession number) или коллекционный номер штамма	Максимальный балл	Наименование штамма	% совпадения
5	AB458207.1	1219	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	AF168124.1	1219	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100
	AB458205.1	1219	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	Z98001.1	1212	<i>Trichophyton interdigitale</i>	99
	AB458202.1	1219	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	EU181446.1	1206	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100
9	AB458207.1	1218	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	AF168124.1	1218	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100
	AB458205.1	1218	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	Z98001.1	1210	<i>Trichophyton interdigitale</i>	99
	AB458202.1	1218	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	100	JN133969.1	1206	<i>Trichophyton interdigitale</i>	100

Таким образом, в ходе исследований идентифицированы анаформа дерматомицета *Trichophyton interdigitale* и его телеоформа *Arthroderma vanbreuseghemii*.

В результате молекулярно-генетической идентификации штамма, проведенной в лаборатории коллективного пользования РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, выявлено, что культуры являются телеоморфой дерматомицета *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, известной как *Arthroderma vanbreuseghemii* со 100%-ной достоверностью.

Как известно, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* – типичный антропофильный дерматомицет,

бархатистый вариант *T. mentagrophytes*. Зрелые колонии чаще белые, бархатистые, цвет может варьировать от розового до коричневого, поверхность ровная, реже радиально исчерченная, с углублением в центре. На картофельном агаре при 25°C колонии *T. interdigitale* обычно белые и пушистые, могут быть от порошистых до зернистых. Пигмент меняется от желтого до коричневого, иногда винно-красный. При микроскопии выявляют длинный, ветвистый, септированный мицелий с тонкими завитками и спиральями. Гифы однотипны с зоофильным вариантом. Встречаются узловатые органы и интеркалярные хламидоспоры. Макроконидии встречаются редко [17].

При первичном выделении культуры антропофильные штаммы *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 и №9 имели фенотипическое сходство. В дальнейшем установлено, что штамм гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 отличается полиморфизмом, у него выявлено появление новых культуральных признаков и морфологическое разнообразие микроструктур. Считаем, что к появлению морфологически разнородных колоний штаммов привело длительное хранение культур методом субкультивирования.

Штамм гриба *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9 имел более стабильные культурально-морфологические признаки. Анализ биохимических свойств позволил выявить наличие уреазной и кератинолитической активности у обоих штаммов, сахаролитические свойства имели сходство только в отношении глюкозы.

Анализ культуральных, морфологических и биохимических свойств позволил сделать заключение:

- клинический штамм №5 является типичным представителем антропофильных дерматомицетов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, отличается наличием характерных культурально-морфологических признаков, высокой сахаролитической активностью, активно усваивает мочевины;

- клинический штамм №9 является типичным представителем антропофильных дерматомицетов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, отличается наличием типичных культурально-морфологических признаков, отличается слабой сахаролитической активностью, активно усваивает мочевины.

Классические генетические исследования, которые разграничивали группы интерфертильности в пределах *A. benhamiae* и *A. vanbreuseghemii*, были проведены региональными исследованиями комплексных изолятов *T. mentagrophytes* в нескольких частях мира [18], включая Западную Европу [19], Восточную Европу [20, 21], Японию [22], Северную Америку [23].

Полученные нами результаты согласуются с данными различных исследователей, которые утверждают, что антропофильные *T. mentagrophytes* развились из спаривающегося штамма *A. vanbreuseghemii* (+). Они доказали это наличием группы с высокой подвижностью: *HMG*, т.е. ДНК-связывающего домена в зоофильных дерматофитах *A. benhamiae*, *A. simii*

и *A. vanbreuseghemii*, которые имеют два типа спаривания: тип спаривания (МАТ) (-) – специфичный ген МАТ1-1 (альфа-бокс) и МАТ (+) – специфический ген МАТ1-2. Согласно данным, полученным Kano R. (2012), последовательность МАТ1-1 составляла около 1,3 т.п.н. и содержала 2 экзона в штамме спаривающегося типа *A. benhamiae*, *A. simii* и *A. vanbreuseghemii* (-). Последовательность МАТ1-2 составляла 1,9 т.п.н. и содержала 2 экзона в штамме спаривающегося типа *A. benhamiae*, *A. simii* и *A. vanbreuseghemii* (+). Из 15 исследованных изолятов животных и 72 изолятов человека МАТ1-1 был обнаружен авторами в 5 изолятах животных и ни в одном из изолятов человека, тогда как МАТ1-2 был обнаружен в остальных 10 изолятах животных и во всех человеческих изолятах [24].

Анализ тридцати девяти изолятов *Arthroderma vanbreuseghemii*, идентифицированных по спариванию, которые были проанализированы Anzawa K., с соавторами (2011) для определения генотипов их внутренней транскрибируемой спейсерной (*ITS*) области рибосомного гена РНК, показал, что двадцать два изолята типа спаривания (+) и четыре (-) показали генотип *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, девять изолятов типа спаривания (+) и четыре (-) показали генотип *A. vanbreuseghemii*. Девять из 14 изолятов с морфологией гранулярных или астероидных колоний показали генотип *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Авторами не было установлено не никакой связи между генотипом и морфологией или типом спаривания изолятов. Авторами было доказано, что генотип изолятов *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* включает в себя не только сексуально вырожденные зоофильные штаммы с морфологией зернистых колоний, а также сексуально и морфологически вырожденные антропофильные штаммы и может представлять собой генотип гетерогенного вида *A. vanbreuseghemii* [25].

В то же время создавшаяся ситуация с идентификацией по *Trichophyton interdigitale*, которая обычно считается анаморфой *Arthroderma vanbreuseghemii*, основанной на секвенировании внутреннего транскрибированного спейсера (*ITS*), приводит к путанице в достоверной идентификации штаммов.

Ряд авторов считает, что создавшуюся проблему на основе одновременного присвоения штаммам двух названий через их анаморфную/телеоморфную связь следует предупредить на основе филогении β-тубулина. В своих исследо-

ваниях им удалось добиться 100% отличия штаммов. Последовательности *ITS* и *D1/D2* их изолята были на 99% гомологичны *A. vanbreuseghemii*, а последовательность  $\beta$ -тубулина была на 100% идентична *T. interdigitale*. Как видно, авторам удалось идентифицировать изолят от кроликов как *T. interdigitale* на основании анализа максимальной вероятности  $\beta$ -тубулина [26]. Выражаем солидарность авторам статьи и считаем исследования в данной области весьма важными для науки и клинической микологии.

Штамм *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №5 *F-Tm-i-5* депонирован в Коллекции микроорганизмов ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» НЦБ РК КН МОН Республики Казахстан с регистрационным номером М-59-13/Д, как штамм-продуцент специфических антигенов. Штамм *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* №9 *F-Tm-i-9* хранится в Коллекции микроорганизмов лаборатории биотехнологии грибов КАТУ им. С.Сейфуллина.

### Заключение

На основании вышеизложенного, можно сделать следующие выводы:

1 Выделенные из биологического материала штаммы дерматомицетов, являются представителями антропофильных дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*;

2 Штаммы *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* отличаются высокой полиморфностью культуральных признаков, наличием типичных мор-

фологических структур, высокой сахаролитической и уреазной активностью;

3 Анализ нуклеотидной последовательности посредством анализа *ITS* региона в *BLAST* позволил подтвердить результаты культурально-морфологической характеристики и идентифицировать штаммы как представителей рода *Trichophyton* вида *mentagrophytes* разновидности *interdigitale* и как представителей рода *Arthroderma* вида *vanbreuseghemii*;

4 Анаморфы несовершенных грибов *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* имеют совершенную форму гриба, которая идентифицирована как телеоморфа *Arthroderma vanbreuseghemii*.

### Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликтов интересов.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Смагуловой А.М., Никулиной А.И., Шевцову А.Б., за содействие в проведении исследований.

### Источник финансирования

Статья подготовлена по результатам исследований, проводимым в рамках научно-исследовательской темы №0118РКИ0321 «Биология микроскопических грибов – возбудителей микозов кожи сельскохозяйственных животных», выполняемой в 2018-2022 гг.

### Литература

- 1 Wael F. El-Tras, Ahmed A. Tayel, Radi A. Mohamed, Doaa M. El-Kordy, Nevein N. El-Kady, Ahmed Samir. Mixed rearing correlates with the existence of *Trichophyton verrucosum* pathogens in humans // *Dermatologica Sinica*. – 33(3). – P. 130-133.
- 2 Общая микология. Строение и классификация грибов // [Электрон. ресурс]. – 2019. – [http://medicine-live.ru/atlas/microgribj/ob\\_mikolog.htm](http://medicine-live.ru/atlas/microgribj/ob_mikolog.htm). (Дата обращения: 04.08.2019).
- 3 Титова Т.Н. Разработка и оценка информативности нового способа детекции *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* в клиническом материале: дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03. – Уфа, 2017. – С. 11-14.
- 4 Белякова Г.А., Дьяков Ю.Т., Тарасов К.Л. Ботаника. Т.1. Водоросли и грибы. – М.: Издат. центр «Академия», 2006. – 320 с.
- 5 Грибковые заболевания кожи: учебное пособие. Под ред. проф. С.И. Данилова. – СПб: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2005. – С. 124.
- 6 Yang Y.P., Sheng P., Liu Z., Li W., Wang J.D., Huang W.M., Fan Y.M. Kerion and Tinea Corporis Caused by Rabbit-Derived *Trichophyton interdigitale* in Three Siblings and One Consulting Doctor Using  $\beta$ -Tubulin Gene to Identify the Pathogen // *Mycopathologia*. – 2016. – 181(7-8). – P. 539-46.
- 7 Hao Zhang, Yuping Ran, Yongfang Liu, Ruifeng Zhang, Xinyu Lin, Wei Yan, Yaling Dai. *Arthroderma vanbreuseghemii* infection in three family members with kerion and tinea corporis // *Medical Mycology*. – Vol. 47, Issue 5. – 2009. – P. 539-544.
- 8 Chollet A., Wespi B., Roosje P., Unger L., Venner M., Goepfert C., Monod M. An outbreak of *Arthroderma vanbreuseghemii* dermatophytosis at a veterinary school associated with an infected horse // *Mycoses*. – 2015. – 58(4). – P. 233-8.

- 9 Kano R., Yamada T., Makimura K., Kawasaki M., Mochizuki T., Kamata H., Hasegawa A. *Arthroderma benhamiae* (the teleomorph of *Trichophyton mentagrophytes*) mating type-specific genes // *Mycopathologia*. 2011 May;171(5):333-7.
- 10 Ramaraj V., Vijayaraman R.S., Hemanth V., Rangarajan S., Kindo A.J. Molecular strain typing of *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) using non-transcribed spacer region as a molecular marker // *Indian J Med Res.* – 2017. – Vol. 146(5). – P. 636-641.
- 11 Deanna A. Sutton. Fothergill A.W., Rinaldi M.G. *Guid to Clinically Significant Fungi* // Саттон Д., А. Фотергилл, М. Ринальди. *Определитель патогенных и условно патогенных грибов: пер. с англ.* – М.: Мир, 2001. – 486 с.
- 12 White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications* // Academic Press, New York, USA. – 1990. – 482 p.
- 13 Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4355.
- 14 Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. – O'Reilly Media, 2003 – 360 p.
- 15 Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // *Briefings in bioinformatics.* – 2004. – Vol. 5. – P. 150-163.
- 16 Clayton R.A., Sutton G., Hinkle P.S., Bult Jr.C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic Bacteriology.* – 1995. – Vol. 45. – P. 595-599.
- 17 Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. *Грибковые инфекции. Руководство для врачей.* – М.: БИНОМ, 2008. – 480 с.
- 18 Summerbell R., Weitzman I. and Padhye A. The *Trichophyton mentagrophytes* complex: Biological species and mating type prevalences of North American isolates, and a review of the worldwide distribution and host associations of species and mating types // *Studies in Mycology.* – 2002. – P. 75-86.
- 19 Contet-Audonnet N., Percebois G. Mating types of strains of the "mentagrophytes complex" in relation to clinical lesions. In: VAN BREUSEGHEM, R. & DE VROEY, C. (eds.): *Sexuality and pathogenicity of fungi.* – Masson, Paris, New York. – 1981. – P. 159-163.
- 20 Hejtmánek M., Hejtmánková N. Hybridization and sexual stimulation in *Trichophyton mentagrophytes* // *Folia Microbiol.* – 1989. – Vol. 34. – P. 77-79.
- 21 Vasilyev O.D., Bogomolova T.S. Tipy sparivaniya i sovershennaya forma shtammov griba *Trichophyton dermatofitiyami* // *Mikol. Fitopatol.* – 1985. – Vol. 19. – 309-317.
- mentagrophytes (Robin) Blanchard, vydelennykh ot bol'nikh
- 22 Hironaga M., Watanabe S. Mating behaviour of Japanese isolates of *Trichophyton mentagrophytes* in relation to their ecological status // *Mycologia.* – 1980. – Vol. 72. – P. 1159-1170.
- 23 Delcourt P.A., Delcourt H.R. Paleoclimates, paleovegetation, and paleofloras of North America north of Mexico during the late quaternary. Chapter 4 (no page numbers) In: *FLORA OF NORTH AMERICA ASSOCIATION* (eds.): *Flora of North America.* Vol. 1 (online edition). – 2000.
- 24 Kano R. Classification of dermatophytes by mating type (MAT) gene analysis // *Med. Mycol. J.* – 2012. – 53(3). – P. 175-8.
- 25 Anzawa K., Kawasaki M., Hironaga M., Mochizuki T. Genetic relationship between *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *Arthroderma vanbreuseghemii* // *Med Mycol J.* – 2011. – 52(3). – P. 223-7.
- 26 Chowdhary A., Singh A., Singh P.K., Khurana A., Meis J.F. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale*/*Trichophyton mentagrophytes* using internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database // *Mycoses.* – 2019. – 62(1). – P. 11-15.

## References

- 1 Anzawa K., Kawasaki M., Hironaga M., Mochizuki T. Genetic relationship between *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *Arthroderma vanbreuseghemii* // *Med Mycol J.* – 2011. – 52(3). – P. 223-7.
- 2 Belaykova G.A., D'aykov Uy.T., Tarasov K.L. *Botanika. T.1. Vodorosli i griby.* – М.: Izdat. centr «Akademia», 2006. – 320 s.
- 3 Chollet A., Wespi B., Roosje P., Unger L., Venner M., Goepfert C., Monod M. An outbreak of *Arthroderma vanbreuseghemii* dermatophytosis at a veterinary school associated with an infected horse // *Mycoses.* – 2015. – 58(4). – P. 233-8.
- 4 Chowdhary A., Singh A., Singh P.K., Khurana A., Meis J.F. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale*/*Trichophyton mentagrophytes* using internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database // *Mycoses.* – 2019. – 62(1). – P. 11-15.
- 5 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic Bacteriology.* – 1995. – Vol. 45. – P. 595-599.
- 6 Contet-Audonnet N., Percebois G. Mating types of strains of the "mentagrophytes complex" in relation to clinical lesions. In: VAN BREUSEGHEM, R. & DE VROEY, C. (eds.): *Sexuality and pathogenicity of fungi.* – Masson, Paris, New York. – 1981. – P. 159-163.
- 7 Deanna A. Sutton. Fothergill A.W., Rinaldi M.G. *Guid to Clinically Significant Fungi* // Саттон Д., А. Фотергилл, М. Ринальди. *Определитель патогенных и условно патогенных грибов: пер. с англ.* – М.: Мир, 2001. – 486 с.
- 8 Delcourt P.A., Delcourt H.R. Paleoclimates, paleovegetation, and paleofloras of North America north of Mexico during the late quaternary. Chapter 4 (no page numbers) In: *FLORA OF NORTH AMERICA ASSOCIATION* (eds.): *Flora of North America.* Vol. 1 (online edition). – 2000.



- 9 Gribkovye zabolevaniya kozhy: uchebnoe posobie. Pod red. prof. S.I. Danilova. – SPb: SPbGMA im. I.I. Mechnikova, 2005. – S. 124.
- 10 Hao Zhang, Yuping Ran, Yongfang Liu, Ruifeng Zhang, Xinyu Lin, Wei Yan, Yaling Dai. Arthroderma vanbreuseghemii infection in three family members with kerion and tinea corporis // *Medical Mycology*. – Vol. 47, Issue 5. – 2009. – P. 539-544.
- 11 Hejtmánek M., Hejtmánková N. Hybridization and sexual stimulation in Trichophyton mentagrophytes // *Folia Microbiol.* – 1989. – Vol. 34. – P. 77-79.
- 12 Hironaga M., Watanabe S. Mating behaviour of Japanese isolates of Trichophyton mentagrophytes in relation to their ecological status // *Mycologia*. – 1980. – Vol. 72. – P. 1159-1170.
- 13 Kano R., Yamada T., Makimura K., Kawasaki M., Mochizuki T., Kamata H., Hasegawa A. Arthroderma benhamiae (the teleomorph of Trichophyton mentagrophytes) mating type-specific genes // *Mycopathologia*. 2011 May;171(5):333-7.
- 14 Kano R. Classification of dermatophytes by mating type (MAT) gene analysis // *Med. Mycol. J.* – 2012. – 53(3). – P. 175-8.
- 15 Korf I., Yandell M., Bedell J. BLAST. – O'Reilly Media, 2003 – 360 p.
- 16 Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // *Briefings in bioinformatics*. – 2004. – Vol. 5. – P. 150-163.
- 17 Obschaay mikologiya. Stroenie i klassifikaciya gribov // [Elektronniy resurs]. – 2019.– URL: – [http://medicine-live.ru/atlas/micro/gribj/ob\\_mikolog.htm](http://medicine-live.ru/atlas/micro/gribj/ob_mikolog.htm). (Data obrascheniya: 04.08.2019).
- 18 Ramaraj V., Vijayaraman R.S., Hemanth V., Rangarajan S., Kindo A.J. Molecular strain typing of Trichophyton mentagrophytes (T. mentagrophytes var. interdigitale) using non-transcribed spacer region as a molecular marker // *Indian J Med Res.* – 2017. – Vol. 146(5). – P. 636-641.
- 19 Sergeev A.Uy., Sergeev Uy.V. Gribkovye infekcii. Rukovodstvo dlay vrachei. – M.: BINOM, 2008. – 480 s.
- 20 Summerbell R., Weitzman I. and Padhye A. The Trichophyton mentagrophytes complex: Biological species and mating type prevalences of North American isolates, and a review of the worldwide distribution and host associations of species and mating types // *Studies in Mycology*. – 2002. – P. 75-86.
- 21 Titova T.N. Razrabotka i otsenka informativnosti novogo sposoba detekzii Microsporum canis, Trichophyton verrucosum i Trichophyton mentagrophytes v klinicheskom materiale: diss. ... kand. biol. nauk: 03.02.03. – Ufa, 2017. – S. 11-14.
- 22 Vasilyev O.D., Bogomolova T.S. Tipy sparivaniya i sovershennaya forma shtammov griba Trichophyton dermatofitiyami // *Mikol. Fitopatol.* – 1985. – Vol. 19. – 309-317.
- 23 Wael F. El-Tras, Ahmed A. Tayel, Radi A. Mohamed, Doaa M. El-Kordy, Nevein N. El-Kady, Ahmed Samir. Mixed rearing correlates with the existence of Trichophyton verrucosum pathogens in humans // *Dermatologica Sinica*. – 33(3). – P. 130-133.
- 24 Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4355.
- 25 White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications* // Academic Press, New York, USA. – 1990. – 482 p.
- 26 Yang Y.P., Sheng P., Liu Z., Li W., Wang J.D., Huang W.M., Fan Y.M. Kerion and Tinea Corporis Caused by Rabbit-Derived Trichophyton interdigitale in Three Siblings and One Consulting Doctor Using  $\beta$ -Tubulin Gene to Identify the Pathogen // *Mycopathologia*. – 2016. – 181(7-8). – P. 539-46.

G.K. Kaiyrmanova<sup>1</sup> ,  
Sh.Zh. Tapeshova<sup>1</sup> , U.T. Shaimerdenova<sup>1</sup> ,  
R.B. Magmiyayev<sup>2</sup> , A.K. Yernazarova<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Scientific Research Institute of Ecology Problems,

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: [aliya.yernazarova@kaznu.kz](mailto:aliya.yernazarova@kaznu.kz)

## IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM OIL RESERVOIR WATER OF THE AKINGEN FIELD, KAZAKHSTAN

Currently, there is a continuous growth of deposits in Western Kazakhstan that are in the late stage of development. Deposits often have a complex heterogeneous structure with hard-to-recover reserves, so for their effective development it is necessary to apply methods of increasing oil recovery. One of the most effective methods of enhanced oil recovery is microbial enhanced oil recovery (MEOR). Microorganisms of the developed oil-reservoir waters, adapted to the extreme underground conditions of the reservoirs, are promising objects for the development of microbiological methods for increasing oil recovery, based on their ability to displace and dilute oil. The article presents the identification of aerobic microorganisms, waterlogged oil reservoir waters of the Akingen field. The aim of this study was to identify microorganisms of oil-reservoir waters of the Akingen field isolated under aerobic conditions. Traditional microbiological and genetic methods of identification of microorganisms are used in the research work. The enzymatic activity of the isolated strains (lipase, amylolytic, proteolytic activity) was evaluated. The emulsification index was carried out according to the Cooper method. As a result of microbiological and genetic studies of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene fragment, 14 aerobic strains of microorganisms were identified as representatives of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus*, in particular, *Bacillus paramycooides*-M1; *B. subtilis* subsp. *spizizenii*-S1; *Bacillus* sp. – M2, A1, A2, A3, A4, A5, S2, S3, D-1X; *P. aeruginosa*-D5, D6, D7. The evaluation of emulsifying activity allowed us to identify 4 strains of microorganisms with a high oil emulsification index: *P. aeruginosa*-D5, D6, D7 (40-49 %) and *Bacillus* sp. D1X (32 %). Isolates *P. aeruginosa* – D5, D6, D7 and *Bacillus* sp. D1X are promising objects for use in enhanced oil recovery technologies.

**Key words:** microorganisms, oil reservoir water, identification, bacteria *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, oil emulsification index.

Г.К. Кайырманова<sup>1</sup>, Ш.Ж. Тапешова<sup>1</sup>, Ұ.Т. Шаймерденова<sup>1</sup>,  
Р.Б. Магмияев<sup>2</sup>, А.К. Ерназарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің  
экологиялар мәселелері ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: [aliya.yernazarova@kaznu.kz](mailto:aliya.yernazarova@kaznu.kz)

### Ақінген мұнай кен орнының мұнай пласт суларынан бөлініп алынған микроорганизмдердің идентификациясы, Қазақстан

Қазіргі уақытта Батыс Қазақстанда мұнай игерудің соңғы сатысында тұрған кен орындары үздіксіз өсуде. Кен орындары көбінесе қиын өндірілетін қорлары бар күрделі гетерогенді құрылымға ие, сондықтан оларды тиімді игеру үшін мұнай шығуын арттыру әдістерін қолдану қажет. Мұнай шығуын арттырудың ең тиімді әдістерінің бірі – микроорганизмдер негізінде мұнай шығуын арттыру (MEOR). Экстремалды жер асты жағдайларына бейімделген мұнай пласт суларының микроорганизмдері мұнайды ығыстыру және сұйылту қабілетіне негізделген пласттардан мұнай шығуын арттырудың микробиологиялық әдістерін әзірлеу үшін перспективті объектілер болып табылады. Мақалада суландырылған Ақінген кен орнының мұнай пласт суларынан білініп алынған аэробты микроорганизмдердің идентификациясы берілген. Зерттеудің мақсаты Ақінген мұнай кен орнының мұнай пласт суларынан аэробты

жағдайда бөлініп алынған микроорганизмдердің идентификациясы анықтау болды. Зерттеу жұмысында микроорганизмдерді идентификациялаудың дәстүрлі микробиологиялық және генетикалық әдістері қолданылды. Бөлінген штаммдардың ферментативті белсенділігіне (липаза, амилитикалық, протеолитикалық белсенділік) бағалау жүргізілді. Эмульгирлеу индексі Купер әдісімен жүргізілді. Геннің 16S rRNA фрагментінің нуклеотидтер тізбегін микробиологиялық және генетикалық зерттеу нәтижесінде микроорганизмдердің 14 аэробты штаммдары *Pseudomonas* және *Bacillus* тұқымдарының өкілдері ретінде анықталды, атап айтқанда *Bacillus paramycoides* – M1; *B. subtilis* subsp. *spizizenii* – S1; *Bacillus* sp. – M2, A1, A2, A3, A4, A5, S2, S3, D-1x; *P. aeruginosa* – D5, D6, D7. Эмульгирлеу белсенділікті бағалау барысында мұнай эмульсиясының жоғары индексіне микроорганизмдердің 4 штаммы ие болды: *P. aeruginosa* – D5, D6, D7 (40–49 %) және *Bacillus* sp. D1X (32 %). *P. aeruginosa* изоляттары – D5, D6, D7 және *Bacillus* sp. D1X пласттардан мұнай шығуын арттыру технологияларында пайдалану үшін перспективті объектілер болып табылады.

**Түйін сөздер:** микроорганизмдер, мұнай пласт суы, идентификация, *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa* бактериялары, эмульгирлеу индексі.

Г.К. Кайырманова<sup>1</sup>, Ш.Ж. Тапешова<sup>1</sup>, Ұ.Т. Шаймерденова<sup>1</sup>,  
Р.Б. Магмияев<sup>2</sup>, А.К. Ерназарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>НИИ Проблем Экологии Казахского национального университета  
имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: aliya.yernazarova@kaznu.kz

### Идентификация микроорганизмов, выделенных из нефтепластовых вод нефтяного месторождения Акинген, Казахстан

В настоящее время непрерывно растет месторождений, в Западной Казахстане которые находятся в поздней стадии разработки. Месторождения часто имеют сложную неоднородную структуру с трудноизвлекаемыми запасами, поэтому для их эффективной разработки необходимо применять методы увеличения нефтеотдачи. Одним из наиболее эффективных методов повышения нефтеотдачи является микробное повышение нефтеотдачи (MEOR). Микроорганизмы разработанных нефтепластовых вод, адаптированные к экстремальным подземным условиям пластов, являются перспективными объектами для разработки микробиологических методов увеличения нефтеотдачи пластов, основанные на их способности вытеснять и разжижать нефть. В статье дана идентификация аэробных микроорганизмов, заводненных нефтепластовых вод месторождения Акинген. Целью настоящего исследования явилась идентификация микроорганизмов нефтепластовых вод месторождения Акинген, выделенных в аэробных условиях. В исследовательской работе использованы традиционные микробиологические и генетические методы идентификации микроорганизмов. Проведена оценка ферментативной активности выделенных штаммов (липазная, амилитическая, протеолитическая активность). Индекс эмульгирования проводился по методу Купера. В результате микробиологических и генетических исследований нуклеотидной последовательности фрагмента 16S rRNA гена, идентифицированы 14 аэробных штаммов микроорганизмов как представители рода *Pseudomonas* и *Bacillus*, в частности, *Bacillus paramycoides* –M1; *B. subtilis* subsp. *spizizenii* –S1; *Bacillus* sp. – M2, A1, A2, A3, A4, A5, S2, S3, D-1X; *P. aeruginosa* – D5, D6, D7. Оценка эмульгирующей активности позволила выделить 4 штамма микроорганизмов с высоким индексом эмульгирования нефти: *P. aeruginosa* – D5, D6, D7 (40–49 %) и *Bacillus* sp. D1X (32 %). Изоляты *P. aeruginosa* – D5, D6, D7 и *Bacillus* sp. D1X являются перспективными объекты для использования в технологиях повышения нефтеотдачи пластов.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, нефтепластовая вода, идентификация, бактерии *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, индекс эмульгирования.

## Introduction

One of the rapidly developing areas of modern microbiology is the study of the microflora of underground ecosystems [1]. Interest in the microorganisms of deep ecosystems is determined by the need to clarify the features of microbial diversity and establish the lower boundary of the

biosphere, as well as the patterns of geochemical activity of microorganisms in the lower layers of the earth for the rational management of biogenic processes [2, 3].

Microbiological methods in the oil industry attract attention with low investment demand, high efficiency and environmental safety. Oil reservoir microorganisms have great biotechnological poten-

tial and are used in technologies for microbiological enhanced oil recovery [4].

Microorganisms of oil reservoirs have been the object of research since 1926. Oil reservoirs are generally characterized by oxygen-free conditions or low oxygen content. Anaerobic acetogens and methanogens of sulfate-, sulfur-, thiosulfate-, iron-reducing and fermenting prokaryotes have been identified in reservoir waters [5, 6, 7]. Aerobic bacteria of oil reservoirs are relatively poorly studied. However, aerobic microorganisms also live in oil reservoirs, where they usually enter with injected water, drilling mud, and as a result of natural hydrodynamic flows [8]. The injected water often contains dissolved oxygen, and an aerobic or microaerobic zone is created in part of the reservoir, where a group of bacteria can develop [9, 10]. In oil fields that are exploited using flooding, aerobic microorganisms are the initial link in the aerobic-anaerobic microbial trophic chain that performs microbial transformation of oil [11, 12]. It is known that the vital activity of microorganisms in reservoir waters with the formation of oil-substituting compounds, apparently, is the basis of microbiological methods for increasing oil recovery in flooded reservoirs [13]. Microbiological methods of enhanced oil recovery can increase current oil production by 10-15 %, which is comparable to the discovery of a new field [14]. Microbiological oxidation of residual heavy oil and its conversion to oil-displacing agents such as carbon dioxide, methane, and surfactants such as polysaccharides, alcohols, and fatty acids increase the mobility of the oil. These substances form an oil shaft and migrate through the reservoir with the water flow, displacing oil from the host rocks [15]. An important stage in the development of such technologies is the selection of bioagents capable of active life in extreme conditions of oil reservoirs.

The aim of this work was to identify the microorganisms isolated from the flooded reservoir water of the Akingen field.

### Materials and methods

The Akingen oil field is located in the Atyrau region of Western Kazakhstan. The field was discovered in 1980, development began on September 1, 1992, and the productive horizon of the oil reservoir is located at a depth of 700-900 m. Oil reservoir water sample collected in spring 2018 From an active well in the Akingen oil field. The initial reservoir pressure is 6.2-12.8 MPa, the temperature is 34-47°C, the pH of the oil reservoir water is

6.34±0.31. The oil density is 842-905 kg/m<sup>3</sup>. Low-sulfur oils (0.15-0.28%), low-paraffin oils-0.88%. The regime of oil deposits is elastic-water-pressure. Formation waters of the chlorocalcium type, with a density of 1078-1105 kg/m<sup>3</sup> and a mineralization of 127.1-162.5 g/l. It is currently in the late stage of development, and the remaining amount of oil in the reservoirs is up to 60% of the original reserve.

The objects of the study were 14 strains of microorganisms isolated by the Koch method under aerobic conditions from the flooded reservoir waters of the Akingen field. The field, in turn, is at a late stage of development and needs to develop microbial methods to improve oil recovery.

To study the biological properties of microorganisms, the following nutrient media were used: *Nutrient Agar*, *Actinomyces Isolation Agar*, *Sabouraud Dextrose Agar*, *Nutrient Broth*, *MPG*, *Ashby medium* (HiMedia Laboratories, Mumbai, India). Aerobic microorganisms were cultured in stationary conditions at a temperature of 40 °C for 24-48 hours.

The study of the isolated microorganisms: morphological, cultural, physiological and biochemical properties of microorganisms. The purity of the isolated cultures of microorganisms was controlled by the generally accepted methods of 3-segment depletion stroke [16]. The phenotypic properties of microorganisms (macro -, micromorphology of microorganisms, cell morphology, motility, presence of spore formation, Gram color, physiological and biochemical characteristics) were studied using traditional (standard) methods [17, 18]. Microscopic studies were performed using a MOTIC B1-220A light binocular microscope (Spain) [19]. The identification of microorganisms was carried out by determining the direct nucleotide sequence of the 16S rRNA gene fragment, followed by determining the nucleotide identity with the sequences deposited in the international Gene Bank database, as well as constructing phylogenetic trees with the nucleotide sequences of the reference strains. Genomic DNA from bacterial cultures was isolated using the method of K. Wilson [20]. Quantitative DNA analysis was performed using a NanoDrop ND 2000 spectrophotometer at a wavelength of 260 nm. For amplification of the 16S RNA site, a reaction mixture of 25 µl was prepared: 12.5 µl Q5 ® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Ins., USA); a pair of universal primers: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 806R (5'-GGACTACCAGGTATCTAAT-3') of 1.2 µl at 10 µM concentration; DNA matrix and water up to 25 µl. The application mode consisted of the fol-



lowing cycles: 95°C for 5 minutes, then: 95°C for 30 seconds, 55°C for 40 seconds, 72°C for 50 seconds for 30 cycles; elongation at 72°C for 10 minutes. PCR products were separated in 1 % agarose gel, the strips were stained with ethidium bromide and visualized in a UV transilluminator. A 1xTBE buffer was used as the electrode buffer. The PCR product was purified using the CleanSweep™ cleaning reagent (ThermoFischer Scientific, USA). The 16S rRNA gene fragments were sequenced using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol [BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems USA]. To clean the sequencing products, the Big-Dye® XTerminator™ Purification Kit was used according to the manufacturer's protocol. Capillary phoresis was performed on a genetic analyzer ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). The sequencing results were processed in the SeqA (Applied Biosystems) program. The search for homologous nucleotide sequences of 16S rRNA genes was carried out using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool) in the International Gene Bank Database of the US National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragments obtained during the study of 14 bacterial strains are placed in GenBank under the numbers: MW386831; MW386832; MW386833; MW386834; MW386835; MW386836; MW386837; MW386838; MW386839; MW386840; MW386841; MW386842; MW386843; MW386844;

Phylogenetic analysis was performed using MEGAX software. The alignment of the nucleotide sequences was performed using the ClustalW algorithm. To construct phylogenetic trees, the Neighbor-Joining (NJ) method was used [21].

The emulsification index was carried out according to the Cooper method [22]. Synthetic glycerin and sterile crude oil from the Akingen field were used to determine the oil emulsification index by microorganisms.

Experimental studies were conducted on the basis of an accredited laboratory of the Research Institute of Ecology of Problems.

## Results

The Akingen oil field is located in the Atyrau region of Western Kazakhstan, in the south-eastern part of the Caspian Basin. Visual characteristics of the oil reservoir water of the Akingen field two-phase liquid, the upper layer is oil, brown color, the lower one is water. The initial reservoir pressure is 6.2-12.8 MPa, the temperature is 34-47°C. Formation water of the chlorocalcium type, with a density of 1078-1105 kg/m<sup>3</sup> and a mineralization of 127.1-162.5 g/l.

Previously, as a result of studies conducted under aerobic conditions, 14 strains of microorganisms were isolated from the flooded oil reservoir of the Akingen field. Table 1 presents the results of morphological and cultural characteristics of microorganisms of oil-reservoir waters.

**Table 1** – Differentiating characteristics of aerobic microorganisms isolated from water-flooded

№	Strains	The conditions of cultivation, t 40 °C	Cell shape	Gram stain	Spore formation	Mobility	Colony morphology
1	M1	aerobic	Long sticks, in pairs	G+	+	-	Shape round, surface smooth, flat, shiny, color white, edge smooth, 10 mm
2	M2	aerobic	Long and thin sticks that exist separately	G+	+	+	The edges of the colonies are smooth, round, the color is white, shiny, the top is flat, 3mm
3	A1	aerobic	Long sticks that exist separately, in pairs, and strepto	G+	+	+	The edges of the colony are rhizoid, cream color, forms mucus, the surface is convex, 10 mm
4	A2	aerobic	Short sticks that exist separately	G+	+	-	The colony is round, the color is white with a yellow tinge, the edges of the colony are smooth, the surface is smooth, shiny
5	A3	aerobic	Short sticks, separately and in pairs	G+	+	-	Colony with irregular edges, cream color, uneven surface, mucus forms, 7 mm

Table continuation

№	Strains	The conditions of cultivation, t 40 °C	Cell shape	Gram stain	Spore formation	Mobility	Colony morphology
6	A4	aerobic	Long sticks that exist separately	G+	+	+	Colony with irregular edges, color white, matte, surface smooth, 5 mm
7	A5	aerobic	Long sticks that exist separately	G+	+	-	The colony is round, the edges are smooth, matte, the color is white, the surface is smooth, 8 mm
8	S1	aerobic	Short sticks that exist separately, in pairs, and strepto	G+	+	-	The edges of the colonies are uneven, wavy, the surface is bumpy, the colony is matte, 4 mm
9	S2	aerobic	Long sticks that exist separately	G+	+	-	The colony is round with irregular edges, the surface is smooth, the colony is shiny
10	S3	aerobic	Long sticks that exist separately	G+	+	-	The edges of the colonies are wavy, matte, white color, smooth surface, 6 mm
11	D-1X	aerobic	Short sticks that exist separately, in pairs	G+	+	-	Colony round, folded surface, matte, slimy, wavy edge, 3 mm
12	D5	aerobic	Short sticks existing separately and in pairs	G-	-	+	Colonies are irregular, convex, shiny, slimy, with blue-green pigment, 2 mm
13	D6	aerobic	Short sticks that exist separately	G-	-	+	Colonies are irregular, convex, shiny, slimy 2-3 mm
14	D7	aerobic	Short sticks that exist separately	G-	-	+	Colonies are irregular, convex, shiny, slimy, with blue-green pigment, 2 mm

Note: «+» – the sign is present, «-» – the sign is absent

As can be seen, from 14 aerobic strains of microorganisms isolated from the reservoir water of the Akingen field: 11 strains of spore-forming, gram-positive (M1, M2, A1, A2, A3, A4, A5, S1, S2, S3, D1X) and 3 strains of non-spore-forming, gram-negative (D5, D6, D7), mono -, diplobacteria with different cell connections (Fig. 1). Cell motility

is observed in 6 strains (M2, A1, A4, D5, D6, D7). Aerobic microorganisms were cultured in stationary conditions at a temperature of 40 °C for 24-48 hours

Table 2 shows the results of the physiological and biochemical characteristics that are necessary to determine the systematic position of various representatives of bacteria.

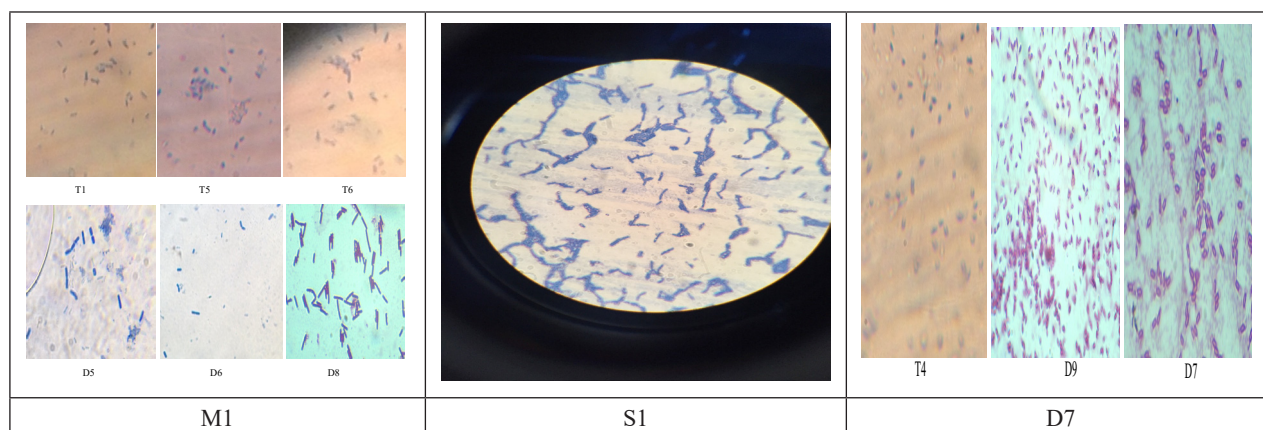


Figure 1 – Morphology of gram-negative (D7) and gram-positive (M1, S1) bacterial cells (nutrient Broth medium, 48 hours of growth, type of Gram staining, 1000x)

**Table 2** – Physiological and biochemical characteristics of aerobic microorganisms isolated from water-flooded

Signs \ Strain	M1	M2	A1	A2	A3	A4	A5	S1	S2	S3	D1X	D5	D6	D7
Catalase activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amylolytic activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Proteolytic activity	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Use of molecular nitrogen	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Lipolytic activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Note: «+» – the sign is present, «-» – the sign is absent

As can be seen, all 14 aerobic strains of microorganisms are catalase-positive. 11 strains (M1, M2, A1, A2, A3, A4, A5, S1, S2, S3, D1 X) hydrolyze starch, hydrolysis zones vary from 1-7 mm, 3 strains (D5, D6, D7) do not hydrolyze starch. Proteolytic activity is observed in 8 strains (M1, A2, A3, A5, D1 X, D5, D6, D7), 6 strains of non-diluting gelatin (M2, A1, A4, S1, S2, S3). Molecular nitrogen uses 8 strains (A1, A4, A5, S2, D1, D5, D6, D7). Oxidase activity was detected in 3 strains (D5, D6, D7), oxidase-negative in 11 strains (M1, M2, A1, A2, A3, A4, A5, S1, S2, S3, D1). Lipolytic activity was not detected in all 14 strains.

As a result of studying the main morphological, cultural, physiological, and biochemical characteristics of 14 strains isolated under aerobic conditions from oil-reservoir waters, we were able to identify them to their generic identity, so 11 strains of mi-

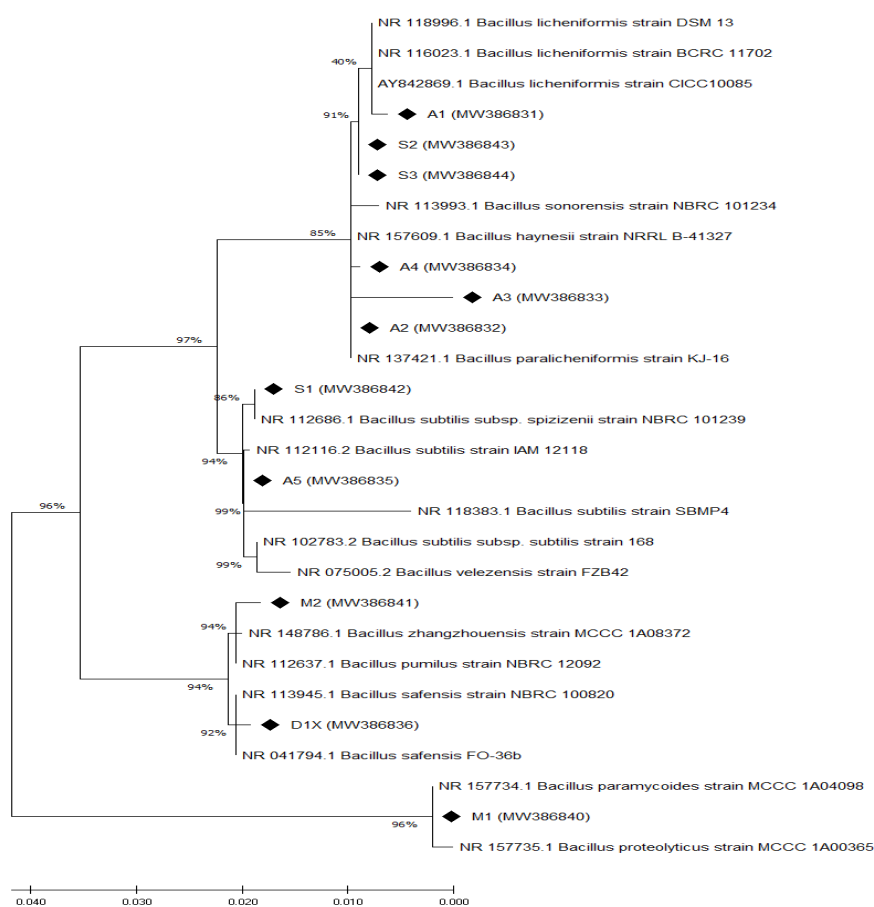
croorganisms (M1, M2, A1, A2, A3, A4, A5, S1, S2, S3, D1) were assigned to the genus *Bacillus*, 3 strains of microorganisms (D5, D6, D7) to the genus *Pseudomonas*.

To determine the species identity of these isolates, genotyping was performed at the conservative 16S rRNA locus (Table 3). Taking into account the literature data (Kumar et al., 2018), indicating the presence of GeneBank nucleotide sequences in international banks (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), we additionally constructed phylogenetic trees with the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of the reference strains of these species. The analysis included the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene, the most phylogenetically related to microorganisms (Fig. 2, 3). Table 3 shows the results of identification of strains of microorganisms.

**Table 3** – The results of the identification of strains by fragment 16S rRNA gene

№	Strains	Closest taxon (GenBank accession no.)	Percent identity %	Identification
1	M1	NR_157734.1	92	<i>Bacillus paramycoides</i>
2	M2	NR_041794.1 NR_148786.1	97	<i>Bacillus sp.</i> <i>B. safensis</i> / <i>B. pumilus</i> /
3	A1	NR_118996.1 NR_157609.1	99	<i>Bacillus sp.</i> <i>B. licheniformis</i> / <i>B. haynesii</i>
4	A2	NR_157609.1 NR_137421.1 NR_118996.1	100	<i>Bacillus sp.</i> <i>B. haynesii</i> / <i>B. paralicheniformis</i> / <i>B. licheniformis</i> /
5	A3	AY842869.1 NR_157609.1	98	<i>Bacillus sp.</i> <i>B. licheniformis</i> / <i>B. haynesii</i>

№	Strains	Closest taxon (GenBank accession no.)	Percent identity %	Identification
6	A4	NR_137421.1 NR_116023.1 NR_157609.1	99	<i>Bacillus</i> sp. <i>B.paralicheniformis</i> / <i>B. licheniformis</i> / <i>B. haynesii</i>
7	A5	NR_075005.2 NR_118383.1	100	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. velezensis</i> / <i>B. subtilis</i>
8	S1	NR_112686.1	99	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>
9	S2	NR_157609.1 NR_116023.1	98	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. haynesii</i> / <i>B. licheniformis</i>
10	S3	NR_157609.1 NR_113993.1	99	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. haynesii</i> / <i>B. sonorensis</i>
11	D1X	NR_113945.1 NR_112637.1 NR_148786.1	99	<i>Bacillus</i> sp. <i>B.safensis</i> / <i>B. pumilus</i> / <i>B.zhangzhouensis</i>
12	D5	NR_113599.1	100	<i>P.aeruginosa</i>
13	D6	NR_117678.1	97	<i>P.aeruginosa</i>
14	D7	NR_117678.1	99	<i>P.aeruginosa</i>

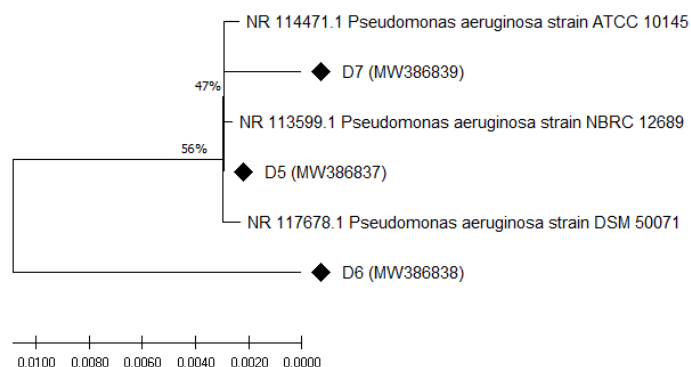


**Figure 2** – Phylogenetic tree that reflects the position of nucleotide sequences of isolated organisms among related sequences of the genus *Bacillus*. The sequences obtained in the course of the work are highlighted in bold. The sequence numbers in GenBank are shown in parentheses



As can be seen from the tabular data, genotyping of 14 aerobic strains of microorganisms based on the analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene 1 strain S1-*Bacillus subtilis subsp.*

*spizizenii* (99 %) and 1 strain M1-*Bacillus paramycooides* (92 %); 9 strains A1, A2, A3, A4, A5, S3, S2, M2, D1X – *Bacillus sp.* (97-100%); 3 strains D5, D6, D7 – *P. aeruginosa* (97-100%).



**Figure 3** – Phylogenetic tree reflecting the position of nucleotide sequences of isolated strains *Pseudomonas aeruginosa*. The sequences obtained in the course of the work are highlighted in bold. The sequence numbers in GenBank are shown in parentheses

Figure 2 shows a phylogenetic tree based on the analysis of the 16S rRNA nucleotide sequences of the isolated strains among the related sequences of the genus *Bacillus*.

Figure 3 shows a phylogenetic tree based on the analysis of the 16S rRNA gene nucleotide sequences from the strains that had the maximum identity to *Pseudomonas aeruginosa* when identified in BLAST.

Figure 3 shows that the nucleotide sequences from samples D5, D6, and D7 are located on the same branch as representatives of *Pseudomonas aeruginosa*. Taking into account the maximum percentage of coincidence of the analyzed sequence in the international database using the BLAST algorithm, as well as the results of phylogenetic analysis (Fig. 2, 3), it was found that 14 aerobic microorganisms isolated from oil-reservoir water, 11 strains belong to the genus *Bacillus*, in particular: S1 (MW386842) – *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*; M1 (MW386841) – *Bacillus paramycooides*; M2 (MW386840), A1 (MW386831), A2 (MW386832), A3 (MW386833), A4 (MW386834), A5 (MW386835), S2 (MW386843), S3 (MW386844) D1X (MW386836) – *Bacillus sp.* 3 strain D5 (MW386837), D6 (MW386838), D7 (MW386839) – *P. aeruginosa*.

In their vital activity, microorganisms form metabolites that have the necessary properties to increase oil production. Metabolites: acids, gases (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>,

N<sub>2</sub>), solvents, bioavailants that affect the processes of oil displacement in reservoir systems, including reservoir fluids and porous media [3].

It is known that the presence of hydrocarbons in the culture medium, some microorganisms synthesize surfactants that can affect the processes of oil displacement by forming the smallest oil emulsions. Such microorganisms-producers of bioemulsifiers of petroleum hydrocarbons contribute to the dispersion of oil, which increases the effectiveness of the contact of bacteria with oil. Determination of the emulsifying activity of the culture liquid is an important characteristic of microbial strains as producers of surfactants.

The ability of microorganisms to form surfactants was evaluated by the emulsification index, based on the property of various microbial surfactants to form the smallest emulsions at the “liquid-hydrophobic substrate” phase boundary. The determination of the emulsification index is an important characteristic of microbial strains as producers of surfactants. Biofuels dilute the oil, making it more mobile and reducing the tension between the oil and the reservoir [3, 23].

Earlier in our studies, it was shown that the studied strains of microorganisms have endogenous emulsifying activity, i.e., the ability of microorganisms to form cell-bound biosurfactants. Oil was used as hydrophobic substrates for the determination of emulsifying activity.

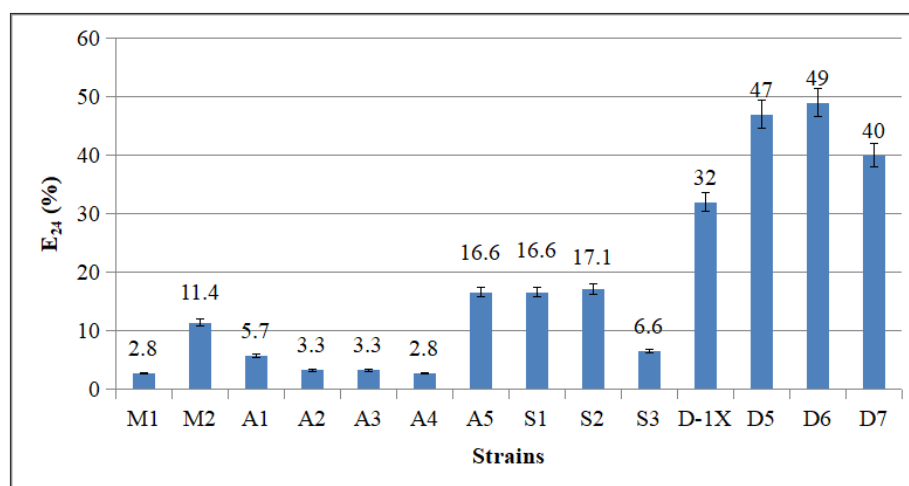


Figure 4 – Definition of the emulsification index

The ability of microorganisms to produce bio-emulsifiers that disperse oil, increasing the bioavailability of petroleum hydrocarbons for microorganisms, was studied by determining the endogenous oil-emulsifying activity after 24 hours in a culture liquid without centrifuging the cells of microorganisms [22]. The results of the study of the oil-emulsifying properties of the studied bacterial strains are shown in Fig. 4.

As can be seen, all strains have the properties of oil emulsification. The maximum index of emulsification is observed in 3 strains: *P. aeruginosa*-D5, D6, D7 and is 40-49%, in other strains the index of emulsification is in the range of 2.8-32%. It should be noted that, among others, the maximum emulsification index was 32% for the *Bacillus* sp. D1X strain.

According to the literature data, microorganisms with an emulsification index of more than 50% are considered promising producers of surfactants. Since the microbial cell oxidizes hydrocarbons by adsorbing on their surface, as a result, the oil-oxidizing activity of cultures depends on its ability to utilize the hydrocarbon substrate [24].

## Discussion

Representatives of the following microorganisms of the genus *Pseudomonas*, *Bacillus* were determined under aerobic conditions.

It is known that allochthonous bacteria coming from the injected water and native microflora are present in the developed oil reservoirs [3].

The presence of microorganisms of the genus *Bacillus* shows in the developed oil reservoirs is due to the fact that they are facultative anaerobes.

Representatives of this genus have a significant potential for use in processes affecting oil reservoirs, including due to their ability to form spores, and are also resistant to stressful changes in environmental conditions that are inevitable when microorganisms are injected from the surface into the oil reservoir [23, 25].

In high-temperature oil reservoirs of Russia, Kazakhstan and China, hydrocarbon-oxidizing bacteria are essential components of the biocenosis of the bottom-hole zone of injection wells, through which dissolved oxygen enters the reservoir [26].

The presence of the bacterium *P. aeruginosa* indicates an active gas exchange of the layers with the surface. Fluorescent aerobic bacteria from the genus *Pseudomonas* have been found in the reservoir waters of many oil fields. Many authors have shown that members of the genus *Pseudomonas* are permanent inhabitants of reservoir waters. Bacteria of this genus are well adapted to exist in aerobic conditions [11, 27].

## Conclusion

The results obtained indicate that aerobic microorganisms live in the reservoir waters. It was revealed that 14 microorganisms isolated under aerobic conditions from the developed oil-reservoir waters of the Akingen field, according to morphological, cultural, physiological, and biochemical properties and the determination of the direct nucleotide sequence of the 16S rRNA fragment of the gene, made it possible to identify strains S1 (MW386842) – *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*; M1 (MW386841) – *Bacillus paramycooides*; M2 (MW386840), A1 (MW386831), A2 (MW386832), A3 (MW386833), A4 (MW386834),

A5 (MW386835), S2 (MW386843), S3 (MW386844) D1X (MW386836) – *Bacillus* sp. 3 strain D5 (MW386837), D6 (MW386838), D7 (MW386839) – *P. aeruginosa*.

It was found that the evaluation of the emulsifying activity allowed us to identify 4 strains of microorganisms with a high oil emulsification index: *Ps. aeruginosa*-D5, D6, D7 (40-49 %) and *Bacillus* sp. D1X (32 %).

The isolates of *Ps. aeruginosa*-D5, D6, D7 and *Bacillus* sp. D1X are promising objects for use in microbial enhanced oil recovery.

### Conflict of interest

All authors have read and are familiar with the contents of the article and have no conflict of objectives.

### Source of financing

The work was carried out according to the project AP 05134797 “Creating a technological scheme for MEOR”.

### References

- Griebler C. and Lueders T. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems // *Freshwater Biology*. – 2009. – Vol. 54. – P. 649–677.
- Nilsen R.K., Beeder J., Thorstenson T., Torsvik T. Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field water and oil reservoirs // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – Vol. 62(5). – P. 1793-1798.
- Nazina T. N., Pavlova N. K., Tatarkin Yu. V., Shestakova N. M., Babich T. L., Sokolova D. Sh, Ivoilov V. S., Khisametdinov M. R., Ibatullin R. R., Tourova T. P., Belyaev S. S., Ivanova M. V. Microorganisms of the Carbonate Petroleum Reservoir 302 of the Romashkinskoe Oilfield and Their Biotechnological Potential // *Microbiology*. – 2013. – Vol. 82(2). – P. 190–200.
- Lin J., Hao B., Cao G., Wang J., Feng Y., Tan X. and Wang W. A study on the microbial community structure in oil reservoirs developed by waterflooding // *Journal of Petroleum Science and Engineering*. – 2014. – Vol. 122. – P. 354–359.
- Francy D.S. Thomas J.M., Raymond R.L., Ward C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria // *J. Ind. Microbiol.* – 1991. – Vol. 8. – P. 237-246.
- Pannekens M., Kroll L., Müller H., Tall Mbow F. and Meckenstock R. U. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms // *New BIOTECHNOLOGY*. – 2019. – Vol. 49. – P. 1–92.
- Yernazarova A.K., Kaiyrmanova G.K., Baubekova A.S., Zhubanova A.A. Microbial Enhanced Oil Recovery // *Book: Enhanced oil recovery*. – 2016. – P. 145-167.
- Havemann G.D., Clement B.G., Kozicki K.M., Meling T., Beeder J., Sunde E. New Microbial Method Shows Promise in EOR // *J Pet Technol.* – 2015. – Vol. 67 (03). – P. 32–35.
- Venkata R. K., Chaiyulu N.C., Karanth N.I. Mathematical Model for the Production of Bio-surfactants by *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6: Production of Biomass // *J. of Chemical Technology and Biotechnology*. – 1991. – Vol. 51(4). – P. 525-538.
- Muslimov R., Kandaurova G., Wagner M. et al. Microbial Improved Oil Recovery in Carbonate Reservoirs – Preparation of Pilot Project in the Oil Field Romashkino, Republic of Tatarstan (CIS) // *Proc. of VII European Symposium on Enhanced Oil Recovery. Moscow*. – 1993. – P. 496-506.
- Cui Q, Sun S, Luo Y, Yu L, Zhang Z. Comparison of in-situ and ex-situ microbial enhanced oil recovery by strain *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 in laboratory sand-pack columns // *Petroleum. Science and Technology*. – 2017. – Vol. 35(21). – P. 2044-2050.
- Watanabe Y. Review on microbial ecology in the deep subterranean environment // *Quart. Abstr. Cent. Res. Inst. Elec. Power Ind.* – 1997. – Vol. 77. – P. 11-12.
- El-Sheshtawy H.S., Aiad I., Osman M.E., Abo-Elnasr A.A., Kobisy A.S. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria // *Egypt J Pet.* – 2016. – Vol. 24. – P.155–162.
- Shibulal B., Al – Bahry S. N., Al – Wahaibi Y. M., Elshafie A. E., Al – Bemani A. S., Joshi S. J. Microbial enhanced heavy oil recovery by the aid of inhabitant spore- forming bacteria: an insight review // *Sci. World J.* – 2014. – Vol. 12. P. 342-356.
- da Cunha C.D., Rosado A.S., Sebastian G.V., Seldin L., von der Weid I. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2006. – Vol. 73(4). – P. 949-59.
- Егоров Н. С. Практикум по микробиологии // Под ред. Егоров Н. С. Учебное пособие. М., Изд-во Моск. ун-та. – 1976. – 307 с. – С. 119-147. [Egorov N. S. Workshop on Microbiology // Ed. Egorov N. S. Textbook. M., Publishing house Mosk. University. – 1976. – 307 p. – P. 119-147 (in Russian)].
- Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ. – 1995. – 224 с. [Egorov N.S. Guide to practical classes in Microbiology. Moscow: MSU. – 1995. – 224 p. (in Russian)]
- Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Дрофа. – 2004. – 256 с. [Tepper E. Z., Shilnikova V. K., Pereverzeva G. I. Practical work on Microbiology. – Moscow: Drofa. – 2004. – 256 p. (in Russian)]

- 19 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия. – 2005. – 608 с. [Netrusov A. I., Egorova M. A., Zakharchuk L. M. et al. Workshop on Microbiology / Ed. by A. I. Netrusov, Moscow: Akademiya. – 2005. – 608 p. (in Russian)]
- 20 Wilson, K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria // *Current Protocols in Molecular Biology*. – 2001. – Vol. 56(1). – P. 2.4.1–2.4.5.
- 21 Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35(6). – P. 1547-1549.
- 22 Cooper D.G. and Goldenberg B.G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species // *Appl Environ Microbiol*. – 1987. – Vol. 53 (2). – P 224–229.
- 23 Nazina T, Sokolova D, Grouzdev D, Semenova E, Babich T, Bidzhieva S, Serdukov D, Volkov D, Bugaev K, Ershov A, Khisametdinov M, Borzenkov I. The Potential Application of Microorganisms for Sustainable Petroleum Recovery from Heavy Oil Reservoirs // *Sustainability*. – 2020. – Vol. 12(1). – P. 15.
- 24 Desai J. and Banat I. Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol and Molecular Biology Reviews*. – 1997. – Vol. 61, №1. – P. 47-64.
- 25 Nazina T. N., Sokolova D. S., Grigoryan A. A. et al. *Geobacillus jurassicus* sp. nov. a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2005. – Vol. 28(1). – P. 43-53.
- 26 Pelger J.W. Microbial Enhanced Oil Recovery Treatment and Wellbore Stimulation Using Microorganisms to Control Paraffin, Emulsion, Corrosion and Scale Formation // *Microbial Enhanc. Oil Recov. Recent Adv.: Proc. Int. Conf., Norman., Okla, Amsterdam*. – 1991. – P. 451-466.
- 27 Zhao F, Li P, Guo C, Shi R, Zhang Y. Bioaugmentation of oil reservoir indigenous *Pseudomonas aeruginosa* to enhance oil recovery through in-situ biosurfactant production without air injection // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 251. – P. 295-302.



4-бөлім  
**ЗООЛОГИЯ**

---

Section 4  
**ZOOLOGY**

---

Раздел 4  
**ЗООЛОГИЯ**

Г.Б. Кегенова\* , Ә.Қ. Мусағали , С.Е. Шарахметов 

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы  
e-mail: gkegenova78@gmail.com

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ АМУРСКОГО ЧЕБАЧКА *PSEUDORASBORA PARVA* (Temminck et Schlegel, 1846) В ВОДОЕМАХ БАЛКАШСКОГО БАССЕЙНА

Амурский чебачок, или псевдорасбора *Pseudorasbora parva* (Temminck et Schlegel, 1846), стал одним из самых распространенных рыб – вселенцев на евразийском континенте. Естественным ареалом вида являются внутренние водоемы Японии, Тайваня, Хайнаня, Китая и Кореи. В Балхаш – Илийском бассейне этот вид появился во время широкомасштабной акклиматизации растительноядных рыб из водоемов КНР.

В статье представлены результаты изучения изменчивости морфологических и биологических показателей амурского чебачка из разных типов водоемов Балхашского бассейна: ирригационного канала, горного пруда и крупного солоноватоводного озера. Биологический и морфологический анализы проведены по стандартной методике: изучена изменчивость 27 пластических и 13 счетных признаков. Установлено широкое распространение данного вида: амурский чебачок хорошо приспосабливается к условиям различных водоемов и населяющим их сообществам рыб. При сравнении размерно – весовых показателей 3-х выборок из исследованных водоемов, установлены максимальные значения для выборки из водоема пос. Бескайнар. Большая изменчивость проявляется в положении и размерах спинного, грудных, брюшных плавников. По положению анального плавника выборка из пруда у пос. Бескайнар отличается от двух других. Также между исследованными выборками выявлены большие различия по форме головы и тела. В водоемах акклиматизации выявлено значительное расширение пределов изменчивости по многим изученным признакам, что говорит о большом адаптивном потенциале амурского чебачка.

**Ключевые слова:** амурский чебачок, псевдарасбора, чужеродный вид, малые водоемы, Балхашский бассейн, морфологическая изменчивость.

G.B. Kegenova, A.K. Musagali, S.E. Sharakhmetov

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty  
e-mail: gkegenova78@gmail.com

### Morphological variability of the topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva* (Temminck et Schlegel, 1846) In the reservoirs of the Balkhash basin

**Abstract.** The topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva* Temminck et Schlegel, 1846, has become one of the most widespread piscivores on the Eurasian continent [1]. The natural habitat of the species is inland water bodies of Japan, Taiwan, Hainan, China, and Korea. The species dispersed into the Balkhash-Ili basin during large-scale acclimatization of herbivorous fish from water bodies of China.

The article presents the results on the study of the variability of morphological and biological parameters of the Amur chebok *Pseudorasbora parva* from different types of reservoirs in the Balkhash basin. Materials for the studies were caught from the irrigation canal near the Bakanas settlement, from the pond near the Beskainar settlement and from Lake Alakol. According to the results of the trapping, the wide distribution of this species in the most different conditions was established. At comparison of dimensional – weight parameters of 3 samples from the investigated reservoirs, the maximal values for a sample from the reservoir of settlement Beskainar are established. The big variability is shown in position and the sizes of dorsal, pectoral, pelvic fins. According to the position of anal fin, the sample from the pond near Beskainar differs from the other two. Significant differences in the shape of the head and body were also found between the samples studied.

**Key words:** topmouth gudgeon, alien species, small reservoirs, Balkhash basin, morphological variability.

Г.Б. Кегенова, Ә.Қ. Мусағали, С.Е. Шарахметов  
Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.  
e-mail: gkegenova78@gmail.com

### **Балқаш бассейнінің су қоймаларындағы амур шабағының *Pseudorasbora parva* (Temminck et Schlgl, 1846) морфологиялық өзгергіштігі**

Амур шабағы немесе псевдорасбора *Pseudorasbora parva* (Temminck et Schlegel, 1846), Еуроазиялық континенттегі ең көп таралған экументтік балықтардың бірі болды. Түрлердің табиғи ауқымы-Жапония, Тайвань, Хайнан, Қытай және Кореяның ішкі су қоймалары. Балқаш-Іле бассейнінде бұл түр ҚХР су қоймаларынан шөпті балықтардың кең масштабты акклиматизациясы кезінде пайда болды.

Мақалада Балқаш бассейнінің әртүрлі су қоймаларынан Амур шабақтарының морфологиялық және биологиялық көрсеткіштерінің өзгергіштігін зерттеу нәтижелері келтірілген: суару каналы, тау тоғаны және ірі суы бар көл. Биологиялық және морфологиялық талдаулар стандартты әдістеме бойынша жүргізілді: 27 пластикалық және 13 есептік белгілердің өзгергіштігі зерттелді. Бұл түрдің кең таралуы анықталды: Амур шабақтары әртүрлі су объектілерінің жағдайларына және оларды мекендейтін балық қауымдастықтарына жақсы бейімделеді. Зерттелген су қоймаларынан алынған 3 үлгінің Өлшем – салмақ көрсеткіштерін салыстыру кезінде Бесқайнар кентінің су қоймасынан іріктеме үшін ең жоғары мәндер белгіленді. Үлкен өзгергіштік байқалады ережеде және мөлшерде жұлын, кеуде, құрсақ жүзу қанаты. Анальды қыртыстың орналасуы бойынша Бесқайнар кентіндегі тоғаннан сынама алу басқа екеуінен ерекшеленеді. Сондай-ақ, зерттелген үлгілер арасында бас пен дененің пішінінде үлкен айырмашылықтар анықталды. Акклиматизация су қоймаларында көптеген зерттелген белгілер бойынша өзгергіштік шектерінің едәуір кеңеюі анықталды, бұл Амур чебачкасының үлкен бейімделу әлеуетін көрсетеді.

**Түйін сөздер:** амур шабағы, псевдорасбора, бөгде түрлер, кіші су қоймалар, Балқаш бассейні, морфологиялық өзгергіштік.

## **Введение**

Сохранение биологического разнообразия пресноводных экосистем является одной из наиболее острых проблем современной биологии [1,2]. Воздействие человека на пресноводные экосистемы проявляется в использовании воды для питья, бытовых и технологических нужд, орошении сельскохозяйственных культур, загрязнении различными химическими веществами и вселении чужеродных видов – биологических инвазиях [3]. Проблема биологических инвазий, или «загрязнения» чужеродными видами считается одной из наиболее опасных угроз устойчивому существованию благоприятной для человека окружающей среды [4,5].

Амурский чебачок, или псевдорасбора *Pseudorasbora parva* Temminck et Schlegel, 1846, стал одним из самых распространенных рыб – вселенцев на евроазиатском континенте [6-7]. Естественным ареалом вида являются внутренние водоемы Японии, Тайваня, Хайнаня, Китая и Кореи. Этот вид считается одним из наиболее опасных вселенцев [8,9].

В водоемах Казахстана амурский чебачок появился в 1958 г., когда из р. Сунгари (КНР, бассейн реки Амур) завезли личинок белого амура и белого толстолобика в Алматинское плодовое хозяйство [10-112]. Из прудов данный

вид распространился по системе реки Иле, а после в 1960-х годов расширил свой ареал, широко расселившись в водоемах Балкашского бассейна [13].

Целью настоящей работы является изучение изменчивости морфологических и биологических показателей амурского чебачка *Pseudorasbora parva* в различных условиях обитания.

## **Материалы и методы исследования**

Рыбы для исследования были отловлены в следующих водоемах Балкашского бассейна: 1) ирригационном канале в районе пос. Баканас (р.Иле); 2) пруду у поселка Бескайнар (село, расположенное в 32,4 км от Алматы на юго-восток); 3) озере Алаколь (рис. 1).

Отлов рыб проводили в летний период 2018-2020 гг. с помощью мальковой волокуши и рыболовных сачков различной конструкции с ячейей 3-5 м. Рыб для исследований фиксировали в 4%-ном формалине. Подготовленный ихтиологический материал подвергали полному морфометрическому и биологическому анализу по традиционным ихтиологическим методикам (таблица 1) [14]. Работа проведена в лаборатории кафедры биоразнообразия и биоресурсов КазНУ им. аль-Фараби.

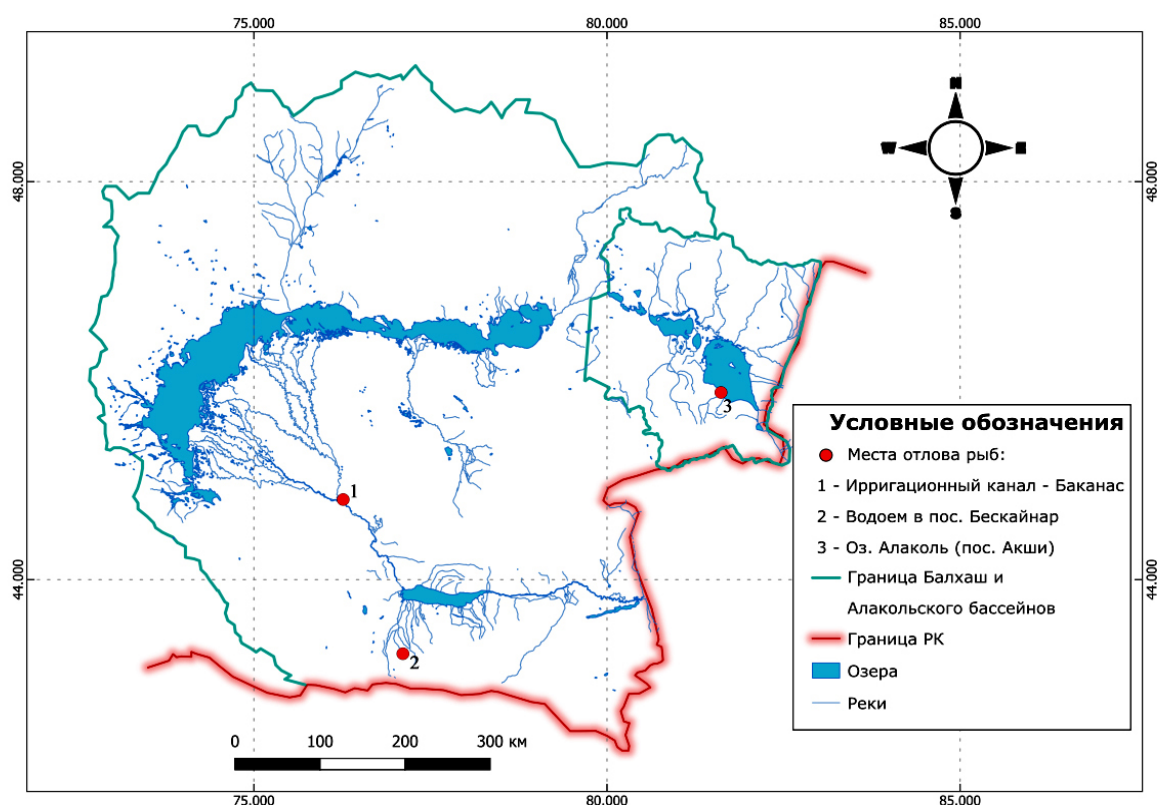


Рисунок 1 – Место сбора ихтиологического материала из Балкаш – Алакольского бассейна в период 2018-2020 гг.

Таблица 1 – Информация о местах сбора ихтиологического материала

№	Название места облова рыб	Координаты пунктов отлова	Дата сбора материала	Биологический анализ	Морфологический анализ
1	Ирригационный канал Баканас	44°49'39"N 76°15'53"E	12.10.2019	31	22
2	Водоем в пос. Бескайнар	43°13'20"N 77°06'38"E	03.05.2018	23	23
3	оз. Алаколь	45°55'39"N 81°35'40"E	16.07.2020	5	5

Всего проанализированы 50 экземпляров рыб по 42 морфометрическим признакам, из них 27 пластических и 13 счетных. Также изучены биологические показатели: общая масса (Q) и масса тела без внутренностей (q), пол, абсолютная плодовитость самок, стадия зрелости гонад самок и самцов, вычислены коэффициенты упитанности рыб по Фультону (F) и Кларк (Cl).

Для обозначения *пластических признаков* использованы следующие символы: L – общая длина тела, l – длина тела до начала хвостово-

го плавника, aD – антедорсальное расстояние (расстояние от рыла до спинного плавника (D)); pD – постдорсальное расстояние (расстояние до анального плавника (aA)), aP – антепектральное расстояние (расстояние от рыла до грудного плавника (P)); aV – антевентральное расстояние (расстояние от конца грудного до начала брюшного плавника (V)); aA – антеанальное расстояние (расстояние от конца брюшного плавника до начала анального плавника (A)); lc – длина хвостового плавника (C); H – наибольшая высо-



та тела;  $h$  – наименьшая высота тела;  $c$  – длина головы;  $ao$  – длина рыла;  $o$  – диаметр глаза горизонтальный;  $op$  – заглазничное расстояние;  $lmd$  – длина нижней челюсти;  $lmx$  – длина верхней челюсти;  $hco$  – высота головы через глаз;  $hc$  – высота головы у затылка;  $io$  – межглазничное расстояние; ширина рта,  $ID$  – длина спинного плавника;  $hD$  – высота спинного плавника;  $IA$  – длина анального плавника,  $hD$  – **высота анального плавника**;  $IP$  – длина грудных плавников;  $IV$  – длина брюшных плавников;  $Cs$  – **длина верхней лопасти хвоста**;  $Sm$  – длина средних лучей хвоста;  $Si$  – длина нижней лопасти хвоста;

Исследованные *меристические* (счетные) *признаки* рыб: количество чешуй в боковой линии, в хвостовом стебле, над боковой линией и под ней – соответственно (l.l, l.l.ca, l.l.s, l.l.i);  $Dg$  – количество неветвистых лучей в спинном плавнике;  $Ds$  – количество ветвистых лучей в спинном плавнике;  $Ag$  – количество неветвистых лучей в анальном плавнике;  $As$  – количество ветвистых лучей в анальном плавнике, и число лучей в грудных  $P$  и брюшных плавниках;  $Vert$  тул. – количество туловищных позвонков;  $Vert$  хв – количество позвонков в хвостовом отделе;  $Vert$  всей – общее количество всех позвонков.

Название рыбы приводится в соответствии с Kottelat M. (2007) [15] и сведений, содержащихся в информационно-поисковой системе Fish Base [16].

Статистическую обработку проводили по общепринятой методике (Лакин, 1990) [17] с использованием компьютерной программы *MS Excel* и Справочника по биологической статистике [18]. Для оценки достоверности различий использован критерий Стьюдента ( $Tst$ ) с уровнем значимости 95 % ( $p < 0,05$ ). **PCA (Principal component analysis)** анализ был проведен с помощью программы PAST 4.07 [19].

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенного анализа показали, что амурский чебачок в условиях Балкашского бассейна адаптировался к обитанию в самых различных условиях: ирригационных каналах, небольших прудах и крупном солоноватоводном озере. Этот вид был отмечен в сообществах, состоящих из самых разнообразных экологических и зоогеографических групп рыб. В ирригационной системе р. Иле амурский чебачок обитает

совместно с плотвой *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), жерехом *Leuciscus aspius* (Linnaeus, 1758), карасем *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), глазчатым горчаком *Rhodeus ocellatus* (Kner, 1866), востробрюшкой *Hemiculter leucisculus* (Basilewski, 1835), *элеотрисом* *Micropercops cinctus* (Dabry de Thiersant, 1872) и *китайским бычком* *Rhinogobius brunneus* (Temminck & Schlegel, 1845). В пруду у пос. Бескайнар ихтиофауна состояла из аборигенных пятнистого губача *Triplophysa strauchii* (Kessler, 1874), балхашского окуня *Perca schrenkii* (Kessler, 1874) и чужеродных карася, глазчатого горчака, востробрюшки, элеотриса и китайского бычка. На мелководьях оз.Алаколь доминировали аборигенные балхашский окунь *Perca schrenkii* Kessler, 1874 и пятнистый губач; чужеродные виды не были многочисленными и представлены карасем, плотвой и элеотрисом. Полученные данные подтверждают результат исследования, проведенного более 10 лет назад о распространении амурского чебачка [20].

Для оценки состояния популяций рыб важными показателями являются размеры, масса и упитанность рыб, а также соотношение полов. Результаты биологического анализа рыб представлены в таблице 2.

При сравнении биологических показателей псевдорасборы с соответствующими данными для естественного ареала [Никольский, 1956] [21] и первых лет после вселения [Баимбетов, 1975] [22] существенных различий не обнаружено. В настоящее время во всех исследованных нами водоемах встречаются как молодые, так и взрослые крупные особи. Масса и упитанность рыб находятся на удовлетворительном уровне. В результате исследований, установлены максимальные значения для выборки из водоема пос. Бескайнар (таблица 2). Среднее значение размера длины тела для выборки из исследованного водоема составило 79,1 мм, минимальный размер по данному показателю характерен для рыб из канала Баканас (36,5 мм). Данный показатель находится ниже известных значений, полученных при более ранних исследованиях, где размеры амурского чебачка из канала Баканас варьировали в пределах 66,3-89 мм [23]. Также по материалам более ранних исследований, размерно – весовые показатели амурского чебачка в возрасте 4+ достигали 93,98 мм полной длины и массы тела до 9,72 г. [22].

**Таблица 2** – Биологические показатели амурского чебачка

признак	Баканас, n=31 (A)		оз.Алаколь, n=5 (B)		пос. Бескайнар, n=23 (C)		Tst		
	M	±d	M	±d	M	±d	Бескайнар-Алаколь BC	Баканас-Бескайнар AC	Баканас-Алаколь AB
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Биологические показатели</b>									
L, мм	36.5	84.2	45.1	147.50	79.1	103.74	5.82	15.85	1.53
l, мм	30.0	1.32	37.9	89.80	64.8	73.05	5.86	19.44	1.87
Q, г	0.5	0.09	1.2	1.84	4.8	3.08	5.05	11.60	1.17
q, г	0.6	0.10	0.8	0.71	3.7	2.42	5.70	9.36	0.69
стадия	2.5	0.14	2.8	1.20	3.0	0.00	0.41	7.25	0.57
питание	2.4	0.17	1.6	1.80	2.2	0.54	1.00	0.74	1.24
жир	1.2	0.18	1.4	1.80	1.3	0.86	0.15	0.58	0.37
Fulton	1.7	0.06	1.8	0.24	1.7	0.03	0.43	0.08	0.41
Clark	1.4	0.06	1.3	0.08	1.3	0.03	0.00	1.96	0.93

Примечание: «нд» – нет данных

Коэффициенты упитанности рыб по Фульто-ну и Кларк по исследованным водоемам сравнительно высокие и схожие между собой (1,73 до 1,82), что находятся в пределах известных значений для водоемов Балкашского бассейна [24-25]. Увеличение коэффициентов упитанности при уменьшении размеров тела рыб могут являться следствием изменении характера обмена веществ в новых условиях [26].

При сравнении данных биологического анализа из 3-х водоемов, установлено, что

наиболее благоприятным местом обитания для амурского чебачка является пруд в пос. Бескайнар, поскольку при наибольших размерах у рыб сохраняется хорошая упитанность.

Соотношение полов в выборке из ирригационного канала Баканас составило 65:35 с преобладанием самцов, выборка отличалась также многочисленностью ювенильных особей.

Сведения по изменчивости морфометрических признаков выборок из 3-х водоемов представлены в таблице 3.

**Таблица 3** – Морфологическая характеристика выборок амурского чебачка из Балкашского бассейна

признак	Баканас, n=31 (A)		оз.Алаколь, n=5 (B)		пос. Бескайнар, n=23 (C)		Tst		
	M	±d	M	±d	M	±d	Бескайнар-Алаколь BC	Баканас-Бескайнар AC	Баканас-Алаколь AB
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Меристические признаки</b>									
III	35.8	0.31	32.3	6.33	35.5	0.26	2.16	0.92	2.31
sup	4.3	0.09	3.5	1.00	4.9	0.09	2.77	3.76	1.44
inf	3.0	0.15	3.5	0.33	3.5	0.94	0.00	1.38	1.44
Dr	1.5	0.10	1.0	0.00	1.0	0.04	1.00	2.74	3.11
Dsf	6.8	0.09	5.0	2.00	7.1	0.08	2.94	2.09	2.42
Ar	1.3	0.09	1.5	0.50	1.0	0.00	1.00	1.67	0.48

Table continuation

признак	Баканас, n=31 (A)		оз.Алаколь, n=5 (B)		пос. Бескайнар, n=23 (C)		Tst		
	M	±d	M	±d	M	±d	Бескайнар-Алаколь BC	Баканас-Бескайнар AC	Баканас-Алаколь AB
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asf	5.0	0.15	4.3	1.33	6.0	0.04	2.43	4.87	0.96
Psf	7.7	0.45	нд	нд	9.9	0.41		5.34	
Vsf	5.8	0.23	нд	нд	6.1	0.21		1.49	
vert тул.	нд	нд	23.0	0.00	24.6	1.80	5.59	нд	нд
vert хв.	нд	нд	15.3	0.33	13.6	1.16	4.29	нд	нд
vert всей	нд	нд	37.0	7.33	38.2	2.24	0.84	нд	нд
<i>Пластические признаки</i>									
aD	53.6	0.40	57.2	2.79	54.2	1.93	3.79	1.74	4.73
aP	34.2	2.04	35.9	3.73	30.3	1.13	6.23	10.28	4.67
aV	46.8	1.50	54.8	4.50	51.3	1.81	3.55	12.01	21.28
aA	70.0	0.75	70.6	12.64	72.4	1.31	1.14	8.18	2.07
lca	21.6	0.64	нд	нд	25.6	0.69	нд	16.72	нд
pD	40.2	0.92	42.2	2.03	54.6	2.79	17.00	35.59	5.04
lD	11.9	0.45	19.8	0.59	16.8	0.63	7.13	22.46	36.02
hD	21.1	0.48	29.4	4.47	26.1	2.66	2.97	13.52	22.43
lA	9.2	0.46	15.2	2.22	12.5	0.46	3.61	16.53	30.09
hA	14.3	0.34	20.9	2.98	18.7	1.76	2.45	14.37	21.69
lP	14.3	0.74	22.2	3.58	20.9	0.86	1.37	24.74	29.68
lV	15.0	0.53	21.8	1.28	21.0	1.28	1.39	21.08	24.08
Cs	23.3	0.63	25.8	7.65	26.4	5.05	0.44	6.18	4.90
Ci	23.2	0.62	28.4	12.16	26.1	4.20	1.27	6.37	11.35
Cm	13.0	0.40	18.4	9.12	15.2	3.68	2.07	5.15	12.80
c	26.8	0.44	33.8	8.54	27.8	0.85	4.56	4.13	30.77
ao	8.4	0.26	15.0	6.68	12.7	0.61	1.92	22.07	33.51
o	7.5	0.31	13.2	3.39	9.6	0.69	4.28	9.72	26.78
op	11.4	0.35	17.7	7.58	14.0	0.40	2.99	14.19	34.44
hop	14.4	0.39	нд	нд	21.5	0.78	нд	31.48	нд
hco	13.4	0.24	19.0	1.41	16.9	0.56	3.45	18.78	30.24
hc	14.4	0.45	23.9	3.02	20.1	1.22	4.25	21.02	35.02
io	10.2	0.27	нд	нд	14.3	0.42	105.30	23.08	57.88
wm	7.8	0.45	нд	нд	9.7	0.72	54.58	8.20	34.16
H	21.5	0.51	28.6	6.78	29.7	1.82	0.93	26.55	22.96
hca	12.0	0.33	18.7	1.19	16.9	1.21	3.41	19.36	26.68
h	9.5	0.24	16.7	0.96	15.4	0.71	2.87	29.93	36.80

В цитированных источниках отсутствуют сведения об изменчивости числа рядов чешуй над и под боковой линией, количеству ветвистых лучей в грудных и брюшных плавниках.

При сравнении выборок из исследованных водоемов (таблица 3), достоверных различий по числу чешуй в боковой линии не обнаружено. В исследованной выборке из оз. Алаколь в среднем

меньше рядов чешуй над боковой линией. Достоверных различий по числу рядов чешуй под боковой линией, числу лучей в спинном плавнике, неветвистых лучей в анальном плавнике и ветвистых лучей в брюшном плавнике между исследуемыми выборками не выявлено. Выборка из пруда у пос. Бескайнар отличается наибольшим числом ветвистых лучей в анальном плавнике, а выборка из оз. Алаколь – наименьшим.

Большая изменчивость проявляется в положении и размерах спинного, грудных, брюшных плавников. По положению анального плавника выборка из пруда у пос. Бескайнар отличается от двух других. Также между исследованными выборками выявлены значительные различия по форме головы и тела. Данные по пространственно-временной изменчивости представлены в таблице 4.

**Таблица 4** – Сравнительная характеристика изменчивости морфометрических признаков амурского чебачка из разных водоемов

Признаки	Наши данные									Сравниваемые водоемы			
	Баканас			Алаколь			Бескайнар			Бас.Амура [21]		Балкашский бассейн [22]	
	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>CV</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>CV</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>CV</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>min</i>	<i>max</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Меристические признаки</b>													
III	34	38	4,8	30	35	7,8	35	36	1,4	35,5	37,4	32	38
Dr	1	2	38,5	1	1	0,0	1	2	20,0	нв	3	нв	3
Dsf	6	7	7,4	4	7	28,3	7	8	4,1	7	7,5	7	7,5
Ar	1	2	40,0	1	2	47,1	1	1	0,0	2	3	2	3
Asf	4	6	16,3	3	5	26,6	5	6	3,5	5,5	6,5	5,5	6,5
Vert	нд	нд	нд	33	39	7,3	35	40	3,9	29	33	29	33
<b>Пластические признаки</b>													
aD	49,1	58,0	4,1	55,6	59,5	2,9	51,3	56,3	2,6	47,7	49,2	46,0	55,7
lca	15,4	30,0	16,6				24,0	27,9	3,2	23,5	24,9	19,3	26,2
pD	33,3	46,4	8,6	40,5	43,8	3,4	51,4	57,6	3,1	нд	нд	34,6	45,0
ID	6,4	16,2	21,2	18,9	20,6	3,9	15,6	18,3	4,7	11,6	12,9	10,4	14,4
hD	15,4	25,0	12,5	27,2	32,2	7,2	23,1	28,6	6,2	20,5	21,5	17,5	25,0
lA	5,1	14,3	27,7	13,6	17,2	9,8	11,6	14,2	5,4	7,7	8,0	7,1	10,0
hA	10,0	17,6	13,0	18,8	22,8	8,3	15,6	20,9	7,1	13,1	13,8	11,2	16,3
IP	10,3	20,0	18,1	20,8	25,0	8,5	19,0	23,0	4,4	16,2	16,8	14,5	20,3
IV	12,9	20,9	13,2	20,6	23,3	5,2	19,0	23,0	5,4	16,7	17,8	14,8	20,4
Cs	12,8	27,3	15,1	23,3	29,7	10,7	19,6	30,5	8,5	19	28	19,3	26,2
c	20,5	33,3	9,2	29,1	36,1	8,6	25,7	29,9	3,3	23,0	24,3	20,0	29,3
ao	5,1	11,9	17,2	11,3	17,8	17,3	11,4	14,4	6,2	7,7	7,8	5,2	9,7
o	3,5	10,3	23,2	10,8	15,1	14,0	8,5	11,2	8,7	5,5	6,1	4,7	9,6
op	7,7	17,6	17,3	13,6	20,3	15,6	12,4	15,1	4,5	9,7	10,6	8,8	13,5
hco	10,3	15,5	9,8	17,5	20,3	6,2	15,5	18,5	4,4	нд	нд	14,3	19,7
hc	10,3	18,2	17,4	21,4	25,0	7,3	18,1	22,3	5,5	нд	нд	14,3	19,7
io	6,1	13,0	14,6	нд	нд	нд	13,0	15,8	4,6	7,5	11,5	7,0	11,5
H	13,7	27,1	13,3	26,4	33,0	9,1	26,8	32,3	4,5	22,1	23,5	19,6	30,3
h	6,8	12,5	14,2	15,5	18,1	5,8	13,5	16,8	5,5	10,4	11,3	9,6	15,9

Примечание: «нд» – нет данных, «нв» – признак не варьирует



У амурского чебачка из оросительных каналов и оз. Алаколь число лучей в спинном и анальном плавниках оказалось меньше, чем в других выборках (таблица 4). Спинной плавник отставлен дальше назад. Значительная изменчивость выявлена по длине хвостового стебля и соответственно постдорсальному расстоянию. У вида также сильно варьируют форма тела, размеры и форма плавников, размер, форма и относительное

расположение различных частей головы.

Полученные нами данные показали, что амурский чебачок обладает удивительной пластичностью, позволяющей ему приспособиться к самым разнообразным условиям (рис.2).

С помощью PCA анализа (анализ главных компонент) выявлено различие пластических признаков псевдорасборы по исследованным водоемам (рис.2).

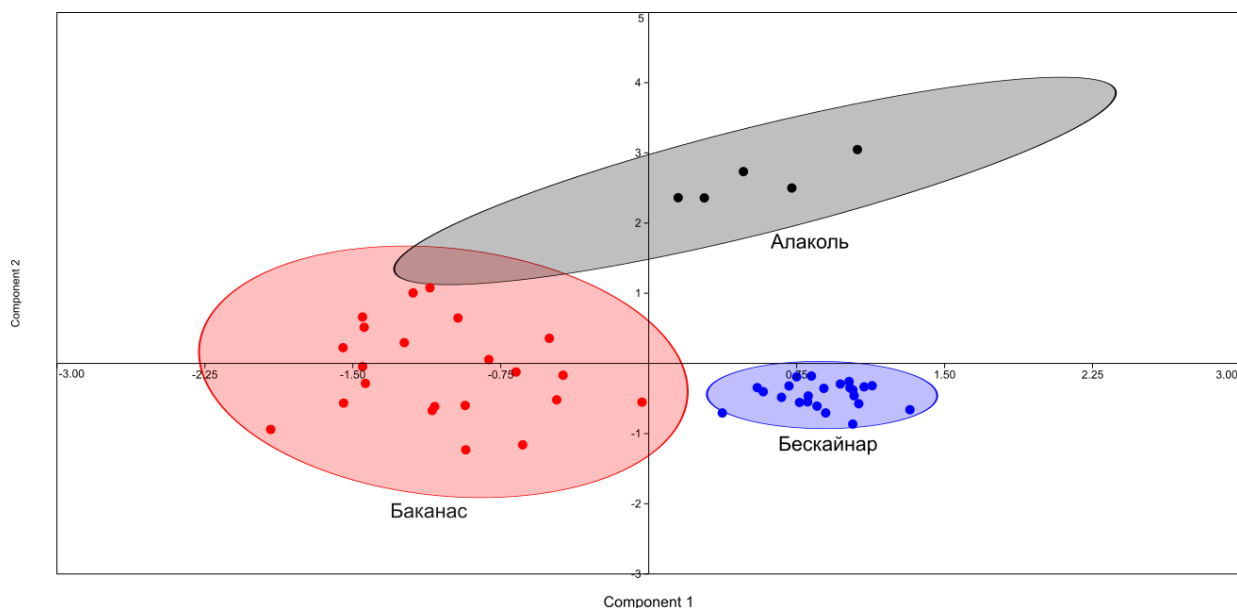


Рисунок 2 – PCA анализ пластических признаков амурского чебачка

Внешний вид рыб зависит от условий окружающей среды гораздо больше, чем у других животных. Форма тела, положение и форма плавников определяют способность рыб к перемещению и совершению различных маневров, а пропорции головы обеспечивают успех в ориентации и добывании пищи [27-28]. В водоемах акклиматизации выявлено значительное расширение пределов изменчивости по многим изученным признакам, что говорит о большом адаптивном потенциале амурского чебачка.

Как известно, морфобиологические признаки вида подвержены изменчивости в пространстве, так как они могут быть привязаны к определенной нише [29]. Помимо экологической изменчивости наблюдаются и генерационная с размерно-возрастным, что проявляется во временном промежутке нерестового сезона.

## Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что в настоящее время амурский чебачок является одним из наиболее распространенных чужеродных видов рыб в Балкашском бассейне. Выборки из разнотипных водоемов характеризуются хорошими показателями упитанности и разновозрастным составом, что указывает на устойчивое состояние популяций. Выявлена большая морфологическая изменчивость данного вида, которая позволяет амурскому чебачку успешно приспосабливаться к различным экологическим условиям.

## Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

### Литература

- 1 Harrison I., Abell R., Darwall W., Thieme M.L., Tickner D., Timboe I. The freshwater biodiversity crisis// Science – 21 Dec 2018 • Vol 362, Issue 6421 • p. 1369 • DOI: 10.1126/science.aav9242
- 2 Abell R., Harrison I.J. A boost for freshwater conservation // Science • 2 Oct 2020 • Vol 370, Issue 6512 • pp. 38-39 • DOI: 10.1126/science.abe3887
- 3 Su G., Logez M., Xu J., Tao S., Villéger S., Brosse S. Human impacts on global freshwater fish biodiversity // Science • 19 Feb 2021 • Vol 371, Issue 6531 • pp. 835-838 • DOI: 10.1126/science.abd3369
- 4 Harmon J.P. Moran N.A., Ives A.R. Species response to environmental change: impacts of food web interactions and evolution// Science – 2009. – Vol.323. – P.1347-1350. DOI DOI: 10.1126/science.1167396
- 5 Hulme Ph.E., Pyšek P., Netwing W., Villà M. Will threat of biological invasions unite the European Union // Science – 3 April 2009. – Vol.324. – P.40-41. DOI DOI: 10.1126/science.1171111.
- 6 Panov, V. 2006. *Pseudorasbora parva*. Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe (DAISIE). [http://www.europe-aliens.org/pdf/Pseudorasbora\\_parva.pdf](http://www.europe-aliens.org/pdf/Pseudorasbora_parva.pdf). (June 2012).
- 7 Карабанов Д.П., Кодухова Ю.В., Пашков А.Н., Решетников А.Н., Махров А.А. «Путешествие на Запад»: В инвазии амурского чебачка *Pseudorasbora parva* (Actinopterygii: Cyprinidae) участвуют представители трёх филогенетических линий// Российский журнал биологических инвазий 2020- № 4, с. 81-95.
- 8 Pinder C., Gozlan R.E., Britton J.R. Dispersal of the invasive topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva* in the UK: a vector for an emergent infectious disease// Fisheries Management and Ecology, 2005, 12, 411–414.
- 9 Самые опасные инвазионные виды России (ТОП-100) / Ред. Ю.Ю. Дгебуадзе, В.Г. Петросян, Л.А. Хляп. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2018. 688 с.
- 10 Дукравец Г.М., Митрофанов В.П. История акклиматизации рыб в Казахстане // В кн.: Рыбы Казахстана. Алма-Ата: Гылым. 1992. Т. 5. С. 6–44.
- 11 Батраева М.Н. О воспроизводительной способности амурского чебачка в условиях прудовых хозяйств предгорной зоны Казахстана// Рыбные ресурсы водоемов Казахстана и их использование. Алма – Ата: Кайнар, 1975 С.67-69.
- 12 Аминова Н.А. Материалы к изучению сорных рыб Фрунзенского рыбхоза// Биологические основы рыбного хозяйства водоемов Ср.Азии и Казахстана: Тез. докл.19 конф. Ашхабад: Ылым, 1986. С.171-172.
- 13 Мамилов Н.Ш., Линник А.С., Ибрагимова Н.А., Мамилов А.Ш., Хабибулин Ф.Х. Динамика рыбного населения малых рек бассейна реки Или // Экосистемы малых рек: биоразнообразие, экология, охрана. Тезисы докладов 2 Всероссийской конференции. Борок, 16–19 ноября 2004 г. Борок: Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина. 2004. С. 57–58.
- 14 Правдин. И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.; Пищевая промышленность, 1966. – С. 376 -379.
- 15 Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland. 2007. – 646 p.
- 16 Froese, R. Pauly D.. Editors. 2021. FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (08/2021).
- 17 Лакин Г.Ф. Биометрия М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
- 18 McDonald J.H. Handbook of biological statistics. Second edition. – Sparky house publishing: Baltimore, Maryland, 2009. – 313 p.
- 19 Hammer Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis //Palaeontologia electronica. – 2001. – Т. 4. – №. 1. – С. 9.
- 20 Мамилов Н.Ш., Балабиева Г.К., Койшыбаева Г.С. Журнал биологических инвазий. №2. 2010. с.29-36.
- 21 Никольский Г.В. Рыбы бассейна Амура. М.: АН СССР, 1956.552 с.
- 22 Баимбетов А.А. *Pseudorasbora parva* (Shlegel) амурский чебачок // Рыбы Казахстана. Под ред. Гвоздев Е.В., Митрофанов В.П. Алма-Ата: Гылым, 1992. Т.5. С.159-169.
- 23 Каримова С.К. Морфология и биология амурского чебачка *Pseudorasbora parva* в Баканасской рисооросительной системе: (Дипломная работа, рук. А.А. Баимбетов), Алма – Ата, КазГУ, 1983 г. 38 с.
- 24 Уразбаев Ж., Абдисаттарова С. К морфологической характеристике амурского чебачка (*Pseudorasbora parva* (Shlegel)) в водоемах низовья Амурарьи // Биол.основы рыбн.х-ва Ср. Азии и Казахстана. Ашхабад: Ылым, 1986. С.316-317.
- 25 Глуховцев И.В., Дукравец Г.М., Карпов В.Е., Митрофанов В.П. Об изучении непромысловых рыб, акклиматизированных в Балхаш – Илийском бассейне // Изв. АН КазССР. Сер.биол. 1987. № 3. С.8-15.
- 26 Langerhans R. B. Predictability of phenotypic differentiation across flow regimes in fishes// Integrative and Comparative Biology. – 2008. –V. 48, №6. – P.750–768. DOI:10.1093/icb/icn092.
- 27 Gatz A. J. Jr. Community organization in fishes as indicated by morphological features// Ecology. – 1979. – V.60. – P.711–718.
- 28 Gatz A. J. Jr. Phenetic packing and community structure: a methodological comment // American Naturalist – 1980. – V.116. – P.147–149.
- 29 Willis S. C., Winemiller K. O., Lopez-Fernandez H. Habitat structural complexity and morphological diversity of fish assemblages in a Neotropical floodplain river.// Oecologia – 2005. – V.142. – P.284–295].

## Referens

1. Abell R., Harrison I.J. A boost for freshwater conservation// *Science* • 2 Oct 2020 • Vol 370, Issue 6512 • pp. 38-39 • DOI: 10.1126/science.abe3887.
2. Aminova N.A. Materials for the study of weed fish Frunze fish farm// *Biological bases of fisheries of reservoirs of Central Asia and Kazakhstan: Tez. dokl.19 conf. Ashgabat: Ylym, 1986. pp.171-172.*
3. Baimbetov A.A. *Pseudorasbora parva* (Schlegel) Amur chebachok // *Fish of Kazakhstan*. Ed. Gvozdev E.V., Mitrofanov V.P. Alma-Ata: Gylym, 1992. Vol.5. pp.159-169.
4. Batraeva M.N. On the reproductive ability of the Amur chebachka in the conditions of pond farms of the foothill zone of Kazakhstan// *Fish resources of reservoirs of Kazakhstan and their use*. Alma – Ata: Kainar, 1975 p.67-69.
5. Dukravets G.M., Mitrofanov V.P. The history of fish acclimatization in Kazakhstan // *In the book: Fish of Kazakhstan*. Alma-Ata: Gylym. 1992. Vol. 5. pp. 6-44.
6. Froese, R. Pauly D. Editors. 2021. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (08/2021).
7. Gatz A. J. Jr. Community organization in fishes as indicated by morphological features// *Ecology*. – 1979. – V.60. – P.711–718.
8. Gatz A. J. Jr. Phenetic packing and community structure: a methodological comment // *American Naturalist* – 1980. – V.116. – P.147–149.
9. Glukhovtsev I.V., Dukravets G.M., Karpov V.E., Mitrofanov V.P. On the study of non-commercial fish acclimatized in the Balkhash-Ili basin // *Izv. AN KazSSR. Ser.biol.* 1987. № 3. pp.8-15. Baimbetov A.A. *Pseudorasbora parva* (Schlegel) Amur chebachok // *Fish of Kazakhstan*. Ed. Gvozdev E.V., Mitrofanov V.P. Alma-Ata: Gylym, 1992. Vol.5. pp.159-169.
10. Hammer Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia electronica*. – 2001. – T. 4. – №. 1. – C. 9.
11. Harmon J.P. Moran N.A., Ives A.R. Species response to environmental change: impacts of food web interactions and evolution// *Science* – 2009. – Vol.323. – P.1347-1350. DOI DOI: 10.1126/science.1167396.
12. Harrison I., Abell R., Darwall W., Thieme M.L., Tickner D., Timboe I. The freshwater biodiversity crisis// *Science* – 21 Dec 2018 • Vol 362, Issue 6421 • p. 1369 • DOI: 10.1126/science.aav9242.
13. Hulme Ph.E., Pyšek P., Netwing W., Villà M. Will threat of biological invasions unite the European Union?// *Science* – 3 April 2009. – Vol.324. – P.40-41. DOI DOI:10.1126/science.1171111.
14. Karabanov D.P., Kodukhova Yu.V., Pashkov A.N., Reshetnikov A.N., Makhrov A.A. "Journey to the West": representatives of three phylogenetic lines participate in the invasion of the Amur chebachka *Pseudorasbora parva* (Actinopterygii: Cyprinidae)// *Russian Journal of Biological Invasions* 2020- No. 4, pp. 81-95.
15. Karimova S.K. Morphology and biology of the Amur chebachka *Pseudorasbora parva* in the Bakanas rice-growing system: (Thesis, by A.A. Baimbetov), Alma – Ata, KazGU, 1983, 38 p.
16. Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland. 2007. – 646 p.
17. Lakin G.F. Biometrics M.: Higher School, 1990. 352 p.
18. Langerhans R. B. Predictability of phenotypic differentiation across flow regimes in fishes// *Integrative and Comparative Biology*. – 2008. – V. 48, №6. – P.750–768. DOI:10.1093/icb/icn092.
19. Mamilov N.S., Balabieva G.K., Koishibaeva G.S. *Journal of Biological Invasions*. No.2. 2010. pp.29-36.
20. Mamilov N.S., Linnik A.S., Ibragimova N.A., Mamilov A.S., Khabibulin F.H. Dynamics of the fish population of small rivers of the Ili river basin // *Ecosystems of small rivers: biodiversity, ecology, protection*. Abstracts of the 2nd All-Russian Conference. Borok, November 16-19, 2004. Borok: I.D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters. 2004. pp. 57-58.
21. Mc Donald J.H. Handbook of biological statistics. Second edition. – Sparky house publishing: Baltimore, Maryland, 2009. – 313 p.
22. Nikolsky G.V. *Fishes of the Amur basin*. Moscow: USSR Academy of Sciences, 1956.552 p.
23. Panov, V. 2006. *Pseudorasbora parva*. Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe (DAISIE). [http://www.europe-aliens.org/pdf/Pseudorasbora\\_parva.pdf](http://www.europe-aliens.org/pdf/Pseudorasbora_parva.pdf). (June 2012).
24. Pinder C., Gozlan R.E., Britton J.R. Dispersal of the invasive topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva* in the UK: a vector for an emergent infectious disease// *Fisheries Management and Ecology*, 2005, 12, 411–414.
25. Pravdin. I.F. Guide to the study of fish. M., Food industry, 1966. – pp. 376-379.
26. Su G., Logez M., Xu J., Tao S., Villéger S., Brosse S. Human impacts on global freshwater fish biodiversity// *Science* • 19 Feb 2021 • Vol 371, Issue 6531 • pp. 835-838 • DOI: 10.1126/science.abd3369.
27. The most dangerous invasive species of Russia (TOP 100) / Ed. Yu.Yu. Dgebuadze, V.G. Petrosyan, L.A. Khlyap. M.: Association of Scientific Publications of the CMC, 2018. 688 p.
28. Urazbayev Zh., Abdissattarova S. On the morphological characteristics of the Amur chebachka (*Pseudorasbora parva* (Schlegel)) in the reservoirs of the lower reaches of the Amu Darya // *Biol.fundamentals of fishn.x-va Sr. Asia and Kazakhstan*. Ashgabat: Ylym, 1986. pp.316-317.
29. Willis S. C., Winemiller K. O., Lopez-Fernandez H. Habitat structural complexity and morphological diversity of fish assemblages in a Neotropical floodplain river // *Oecologia* – 2005. – V.142. – P.284–295].

**В.Г. Мека-Меченко<sup>1\*</sup>** , **В.В. Сутягин<sup>2</sup>** 

<sup>1</sup>Национальный научный центр особо опасных инфекций (ННЦООИ)

им. Масгута Айкимбаева, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Филиал «Талдыкорганская противочумная станция»

ННЦООИ МЗ РК, Казахстан, г. Талдыкорган

\*e-mail: [vm\\_m@bk.ru](mailto:vm_m@bk.ru)

## РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА СЕРОГО СУРКА НА ОГРАНИЧЕННОМ УЧАСТКЕ ЗАИЛИЙСКОГО АЛАТАУ – ЗОНЕ АКТИВНОГО ТУРИЗМА ОКРЕСТНОСТЕЙ АЛМАТЫ

В статье проанализированы литературные и собственные (за период с мая 2007 по июль 2021 гг.) данные по структуре поселений серого сурка (*Marmota baibacina* Kastschenko, 1899) на ограниченном участке северного склона Заилийского Алатау, расположенного вблизи города Алматы и часто посещаемого туристами. Северный склон Заилийского Алатау считается потенциально очаговой по чуме территорией, но, проводить обследование окрестностей г. Алматы с отловом грызунов в настоящее время нецелесообразно, можно ограничиться санитарно-просветительной работой и, по возможности, изучением умерших грызунов или их костных останков. Окончательные результаты мониторинга поселений сурков на участке подтвердили, что их пространственное размещение и колебания численности зависят от комплекса абиотических и биотических факторов, причем антропогенное влияние не является доминирующим. Если люди специально не преследуют сурков, они вполне мирно уживаются с человеком. Отсутствие сурка в низкогорьях и снижение его численности в субальпийском поясе обследуемой территории связано, в первую очередь, с сокращением выпаса скота, которое привело к увеличению высоты травостоя. В альпийской зоне действуют абиотические и биотические факторы.

**Ключевые слова:** серый сурок, Заилийский Алатау, мониторинг, ареал, численность, поселения, бутаны.

V.G. Meka-Mechenko<sup>1\*</sup>, V.V. Sutyagin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>«Masgut Aikimbayev's National Scientific Center for Especially Dangerous Infections» (NSCEDI) MH RK, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Branch «Taldykorgan antiplague station» NSCEDI MH RK, Kazakhstan Taldykorgan

\*e-mail: [vm\\_m@bk.ru](mailto:vm_m@bk.ru)

### Monitoring results of gray marmot in a limited section of Zaili Alatau – area of active tourism in the environment of Almaty

The article analyzes the literature and our own (for the period from May 2007 to July 2021) data on the structure of the gray marmot (*Marmota baibacina* Kastschenko, 1899) settlements on a limited area of the northern slope of the Zailiyskiy Alatau, located near the city of Almaty and often visited by tourists. The northern slope of the Zailiyskiy Alatau is considered a potentially focal area for plague, but it is currently impractical to conduct a survey of the environs of Almaty with the capture of rodents, it is possible to limit ourselves to sanitary and educational work and, if possible, study of dead rodents or their bones. The final results of monitoring marmot settlements on the site confirmed that their spatial distribution and fluctuations in numbers depend on a complex of abiotic and biotic factors, and anthropogenic influence is not dominant. If people do not specifically pursue marmots, they get along quite peacefully with a person. The absence of the marmot in the low mountains and the decrease in its number in the subalpine belt of the surveyed area is associated, first of all, with a decrease in livestock grazing, which led to an increase in the height of the grass stand. In the Alpine zone operates of abiotic and biotic factors.

**Key words:** gray marmot, Zailiyskiy Alatau, monitoring, range, abundance, settlements, butanes.



В.Г. Мека-Меченко<sup>1\*</sup>, В.В. Сутягин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Масғұт Айқымбаев атындағы Аса қауіпті инфекциялар  
Ұлттық ғылыми орталығы (АҚИҰҒО), Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>АҚИҰҒО филиалы «Талдықорған обаға қарсы күрес станциясы», Қазақстан, Талдықорған қ.

\*e-mail: vm\_m@bk.ru

### Алматы маңындағы белсенді туризм аумағы – Іле Алатауының шектеулі аймағындағы сұр суырға жүргізілген мониторинг нәтижелері

Мақалада Алматы қаласының маңында орналасқан және туристер жиі баратын Іле Алатауының солтүстік беткейінің шектеулі аймағын мекендейтін сұр суыр (*Marmota baibacina* Kast-schenko, 1899) қоныстарының құрылымы туралы әдеби және өзіндік (2007 жылғы мамырдан 2021 жылғы шілдеге дейінгі кезең) деректер талданған.

Іле Алатауының солтүстік беткейі оба ауруының әлеуетті ошақтық аймағы болып саналады, бірақ Алматы қаласы маңында кеміргіштерді аулаумен зерттеу жұмыстарын жүргізу қазіргі таңда маңызды емес, санитарлық-ағарту жұмыстарымен шектелуге болады, және мүмкіндігінше, өлген кеміргіштерді немесе олардың сүйек қалдықтарын зерттеу қажет.

Аймақтағы сұр суырлардың қоныстарын бақылаудың соңғы нәтижелері олардың кеңістікте орналасуы мен санының ауытқуы абиотикалық және биотикалық факторлар кешеніне байланысты екенін растады, ал антропогендік әсердің басым еместігін көрсетті.

Егер адамдар сұр суырларды әдейі қудаламаса, олар адаммен бейбіт өмір сүре алады.

Аласа тауларда сұр суырдың болмауы және зерттелген аймақтың субальпілік белдеуінде оның санының азаюы, ең алдымен, мал жаяудың қысқаруымен байланысты, бұл шөптің биіктігінің жоғарылауына әкелді. Альпі аймағында абиотикалық және биотикалық факторлар бар.

**Түйін сөздер:** сұр суыр, Іле Алатауы, мониторинг, таралу аймағы, саны, қоныстануы, бутандар.

## Введение

Серый сурок – эврибионтный, жизненно стойкий, экологически пластичный вид, распространённый на территории Республики Казахстан в восточной части Сарыарки (Казахского мелко-сопочника), на Алтае, в Тарбагатае, Жетысуском (Джунгарском) Алатау и хребтах Северного Тянь-Шаня. Грызун проживает в различных биотопах от горно-степного и лесо-лугово-степного до альпийского на высотах от 800 до 3800 м над уровнем моря. Обследуемый участок расположен на северном склоне хребта Заилийский Алатау, являющимся крайней северо и северо-западной частью ареала серого сурка [1], в границах кунгей-заилийской географической популяции тянь-шаньского подвида серого сурка – одной из наиболее изолированных и недостаточно изученных. Он находится в северо-восточной части чонкеминской местной популяции [2].

Мониторинг проводился с мая 2007 по июль 2021 гг. и его предварительные результаты уже публиковались ранее [3, 4]. В данной статье проанализированы итоги многолетних наблюдений и сделаны окончательные выводы. Общие закономерности вполне прослежены, а для более детального изучения необходимо мечение зверьков с последующим слежением при помощи технических средств. К сожалению, экстраполировать полученные данные на весь ареал серого

сурка нельзя, но они могут вызвать определённый интерес.

## Материал и методы

Обследуемый участок находится на территории Иле-Алатауского государственного природного национального парка. Мониторинг поселений серого сурка проводился на площади 100 км<sup>2</sup> от склона к р. Левый Талгар на востоке, до водораздела между р. Казахкызы (р. Казашка) и р. Кумбель на западе и от ледника Туйыксу на юге, до северного склона г. Котырбулак (43,17° с. ш.) на севере, в пределах высот от 1600 м н. у. м. на северо-западе до 4000 м н. у. м. на юге. На участке постоянно функционируют спортивные комплексы «Медео» и «Чимбулак», остальная территория посещается туристами с различной степенью интенсивности.

Работа проводилась на пеших маршрутах [5] без ночёвки, учёт численности сурков был возможен только в середине дня, по времени, совпавший со сниженной суточной активностью взрослых и полувзрослых зверьков и по этой причине дополнительно учитывались косвенные признаки обитаемости нор (наличие троп, помет, следы расчистки и др.). Картирование закончилось в 2015 году, но впоследствии наблюдение продолжалось, и бутаны серого сурка посещались с частотой от 1 до 5 раз в год.

## Результаты и обсуждение

Кунгей-заилийская географическая популяция расположена на периферии ареала вида, поэтому для нее, как и для многих видовых популяций, характерны относительно высокая амплитуда колебаний численности особей и нестабильность пространственной структуры, по сравнению с центральной его частью [1, 6, 7]. Бутаны (семейные норы) дифференцировались как обитаемые, посещаемые, необитаемые и заплывшие (давно брошенные, с отсутствием следов посещения последние 10 лет). Ландшафт участка сильно расчленён, поселения серого сурка на нём относятся к ленточному и островному типу. А там, где рельеф сильно расчленённый, сезонные кормовые перемещения обычно незначительны и ограничиваются пределами территории, занимаемой колонией [2, 8]. Большинство из наблюдаемых семейных нор относятся к постоянным (зимне-летним), часть заселена только летом и только 1 – зимой. Летом зверьками интенсивно использовались каменные осыпи с диаметром камней от 0,3 до 4,0 м, как находящиеся в непосредственной близости от бутанов, так

и на расстоянии 100-150 м от них. Ниже 3000 м н. у. м. бутаны рядом с удобными осыпями в это время практически не посещались сурками, но в высокогорье, несмотря на активное использование осыпей зверьками различного возраста, норы были расчищены. Это вызывало сложность в дифференцировке обитаемых и посещаемых нор и затрудняло определение размеров семейного участка. На расстоянии более 200 м от бутанов к осени 2017 г. обнаружено 198 защитных нор, но только 9 из них вырыты или использовались в год наблюдения, остальные были старыми или очень старыми. За последние 3 года найдено 17 свежесделанных защитных нор, что говорит об интенсивном расселении сурков. Зафиксировано 38 новых бутанов, а общее количество закартированных составило к осени 2020 г. 197, из них 177 обитаемые или посещаемые и 19 – заплывшие (рисунки 2,4). Необитаемым остался только 1 бутан на высоте 2660 м в 500 м юго-восточнее пер. Терисбутак, заброшенный к лету 2016 г. Все обитаемые бутаны отмечены в пределах от 2450 до 3570 м н. у. м., причём свыше 90,0% постоянно обитаемых находилась в зоне альпийских лугов на высотах 2800-3450 м н. у. м.

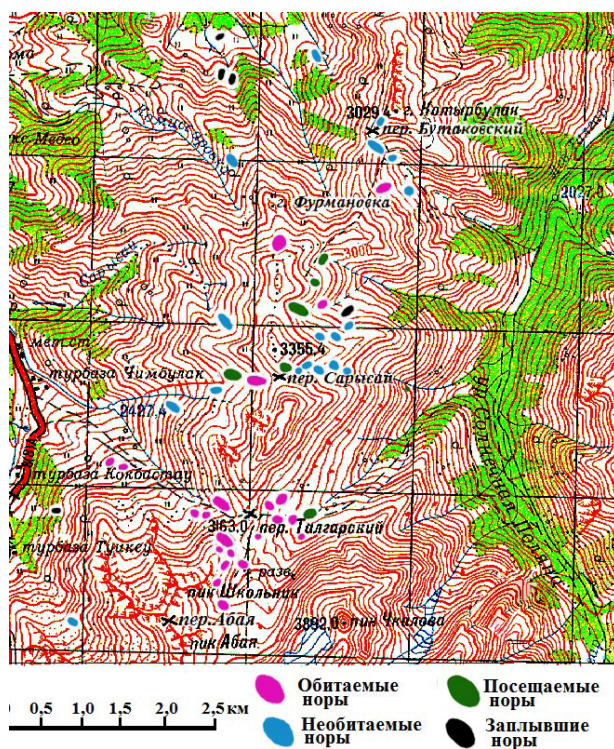


Рисунок 1 – Северо-восточный фрагмент обследованной территории июль 2016 г.

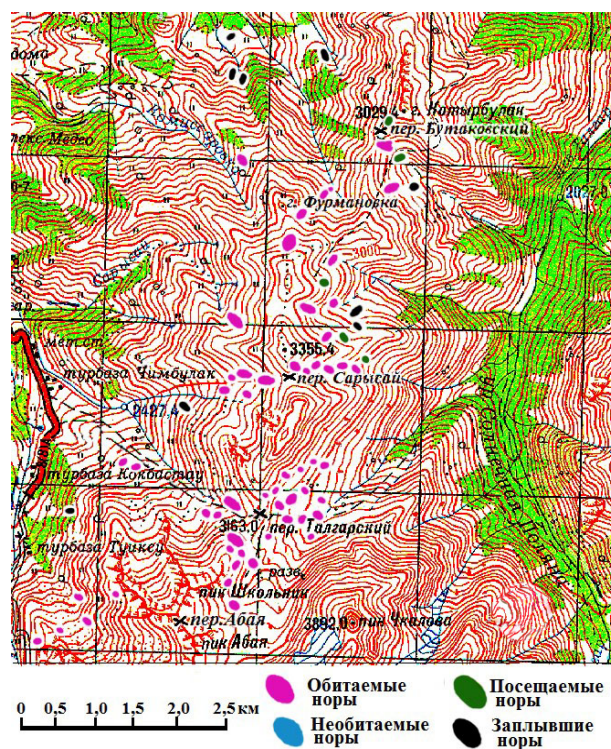


Рисунок 2 – Северо-восточный фрагмент обследованной территории август 2020 г.



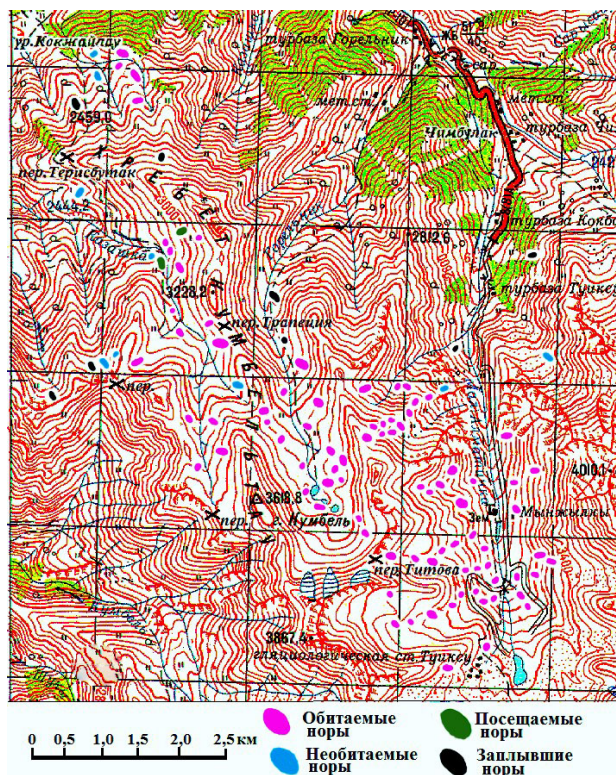


Рисунок 3 – Западный и юго-зап. фрагмент обследованной территории июль 2016 г.

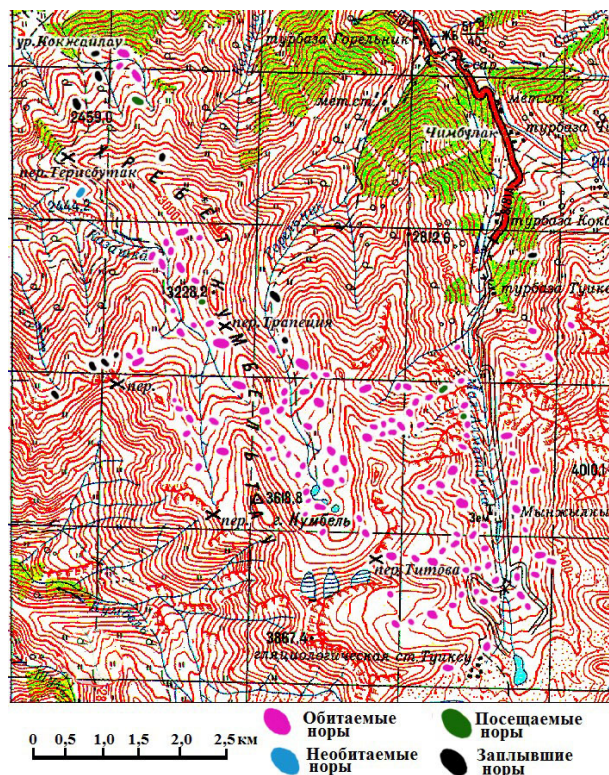


Рисунок 4 – Западный и юго-зап. фрагмент обследованной территории август 2020 г.

Участок мониторинга не относится к группе Тянь-Шаньских высокогорных очагов чумы, где основным носителем является серый сурок [9, 10], но, располагается в непосредственной близости и может считаться потенциально очаговой территорией. В 2013 г., на территории Кыргызской Республики, в урочище Оттук Сарыджазского мезоочага чумы зарегистрирован случай заражения человека бубонной чумой в результате контакта с заболевшим сурком [11]. После этого события, в 2014 году, Талдыкорганской противочумной станцией началось плановое обследование смежных с Сарыджазским очагом участков – Каркаринской потенциально-очаговой территории. В 2014 г. результаты исследования полевого материала на чуму были отрицательными, однако, уже в 2015 г., при эпизоотологическом обследовании территории, от двух серых сурков было выделено два штамма возбудителя чумы [12]. Северный склон Заилийского Алатау – потенциально очаговая по чуме территория [13]. Наблюдаемый участок никогда не обследовался на чуму, а прилегающая территория изучалась более 30 лет назад. Эпизоо-

тологическое обследование было проведено в бассейнах рек Малой и Большой Алматинки на высотах от 1075 до 2100 м н. у. м. в 1993-1994 гг. В результате обследования чумной микроб не обнаружен [14]. Исследованный полевой материал состоял из мышевидных грызунов и их блох, тогда как основным носителем чумы в горных природных очагах чумы является серый сурок [15]. Миграции блох к выходам нор в горных очагах чумы нет и заражение человека чумой от сурков, возможно, только при их разделке или контакте с трупами грызунов. Возникновение эпизоотии чумы на данном участке маловероятно из-за низкой численности сурков, изолированности их поселений и незначительности внутрипопуляционных контактов на обследованной территории, но спорадические случаи заражения вполне возможны. По ней проходят миграции каменки-плясуньи (*Oenanthe isabellina*), вероятного разносчика возбудителя чумы [16, 17]. Как известно, диссеминация возбудителя чумы может осуществляться носителями инфекции путем эстафетной передачи или разносом зараженных блох в ходе миграций позвоночных

– прежде всего, грызунов, наземных хищников, копытных и птиц, из последних давно и вполне обоснованно привлекает внимание каменка-пласунья [18]. В ходе наблюдения периодически фиксировались трупы серых сурков или их костные останки, но исследовать их в лаборатории не удавалось. За последние 6 лет были обнаружены 2 черепа и 3 костных останков серых сурков и они были исследованы одним из авторов методом ПЦР-диагностики в лаборатории Талдыкорганской ПЧС с отрицательным результатом. Минимальный объём материала, естественно, не позволяет сделать конкретные выводы. Конечно, проводить обследование территории с отловом грызунов нецелесообразно, вполне можно ограничиться санитарно-просветительной работой и, по возможности, изучением умерших грызунов или их костных останков.

Данные литературы свидетельствуют о том, что на описываемой территории распространение сурка в первой половине 20 века было гораздо шире. В.И. Капитоновым подробно описаны места обитания серого сурка в Заилийском Алатау: этот грызун обитал на высоте от 1400 до 3500 м н. у. м. В некоторых местах они распространены повсеместно, но плотность их поселений в нижнем поясе очень снижена антропогенным воздействием [19]: уничтожением в результате незаконной охоты, чрезмерной рекреационной нагрузкой и появлением новых объектов инфраструктуры [20]. До недавнего времени на территории ГНПП «Иле-Алатау» в бассейне р. Тургеня сурок был более многочисленным было отмечено негативное влияние посетителей на популяции многих млекопитающих, в том числе и серого сурка [21]. Небольшие поселения сурка ещё остались у истоков реки М. Алматинка в урочище Туюксу и в верховьях рек Комиссаровка и Бутаковка. На перевале Талгар в 2003 г. встречались обитаемые норы, большинство из них были нежилыми. Также в 2010 г. было обнаружено, что большая часть нор сурков не обитаемы [20]. По нашим данным, в верховьях р. Комиссаровка находилось 2 семейных участка серого сурка: нижний на северо-западном склоне г. Фурмановка (800 м сев.-западнее, 2625 м н. у. м.) и верхний – 350 м южнее её на высоте 3060 м н. у. м. [3]. Нижний бутан был обитаемым, в

2007 и 2008 гг. сурки в нём зимовали, но с июня 2008 года на нём никто не жил. Он начал заселяться в начале лета 2010 г., весной 2011 г. выведено потомство, до середины июля наблюдались взрослые зверьки и детёныши, но уже с августа – снова необитаем. Выпас скота в верховьях р. Комиссаровка тогда практически отсутствовал и бутан сильно зарастал, что, скорее всего, способствовало гибели зверьков. В последние 5 лет на территории производится выпас лошадей и коров, высота травостоя значительно сократилась и с конца июня 2020 г. бутан опять заселился, но до июля 2021 г. в нём проживал 1 сурок. В бассейне р. Бутаковка с начала наблюдения фиксировались только необитаемые или заплывшие бутаны на высоте 2200-2500 м н. у. м. Несмотря на постоянный выпас на этой территории лошадей и невысокий травостой, все они постепенно заплывли. Зато в 2018-2019 гг. произошло расселение сурков по с-в. склону г. Фурмановка в верховья р. Бутаковка до высоты 2780 м н. у. м. (рисунки 1, 2). На нижнем бутане, при визуальном наблюдении 27 июля 2021 г., выявлено 11 зверьков: 2 взрослых, 5 молодых перезимовавших и 4 детёныша.

К лету 2015 г. большинство бутанов серого сурка в окрестности пер. Талгарский были обитаемыми и один из больших, хорошо разработанных находился в 150-200 м от конечной станции канатной дороги (рисунок 5а). В настоящее время сурки заселили менее удобную, но пригодную для проживания территорию сев.-вост., в сторону пер. Сарысай (рисунок 2). Зверьки заселили участки, примыкающие к лыжной трассе, привыкли и не обращают внимания на опоры и проезжающие кабины фуникулёра. Туристическая тропа проходит через поселение сурков и люди часто располагаются на бутанах (рисунок 5 б), но это не сильно тревожит зверьков, потому что не совпадает с пиком их активности в теплый период.

В 2018-2019 гг. сурками заселено «Чёртово ущелье», расположенное между пер. Талгарский и «Воротами Туюксу». Сейчас там имеются 4 обитаемых бутана, но рельеф местности и условия существования исключают возможность значительного повышения численности на этой территории.





**Рисунок 5**– а) Обитаемый бутан 250 м ю-з. пер. Талгарский (3250 м н. у. м.),  
б) Туристы на обитаемом бутане у тропы на ледник Богдановича (3220 м н. у. м.)  
(фото В.Г. Мека-Меченко)

Е.М. Вакуленко-Снегиревская отмечала, что летом 1933 г. «жилые норы сурков встречались на 1 километр выше курорта Медео на правом берегу р. М. Алматинки, а в целом поселения серого сурка начинались с высоты 1600-1700 м» [22]. В верховьях р. М. Алматинка летом 2015 г. обитаемые бутаны сурка фиксировались на правобережье сразу за «Воротами Туюксу» с высоты 3000 м, а на левом берегу – с высоты 3100 м, ниже наблюдались только необитаемые или заплывшие норы. В конце августа 2016 г. нижнюю заплывшую нору на левобережье заселили 2 взрослые особи [4], на следующий год они произвели потомство, и весной 2019 г. там уже обитали перезимовавшие молодые зверьки (рисунок 7 б). В середине мая 2020 г., до выхода молодняка, на 3 бутанах ниже «Ворот Туюксу» 2600-2750 м н. у. м проживало 15-16 зверьков, так что заселение серыми сурками этой территории, несомненно. Нижняя граница поселения в долине р. М. Алматинка переместилась за последние годы на 400 м н. у. м. и расширение произошло по естественным причинам, не связанных с деятельностью человека. Южнее и выше в урочищах Мынжилки и Туюксу за последние 4 года образовалось 9 новых бутанов и численность сурков значительно повысилась (рисунки 3-4). По нашим наблюдениям, несмотря на очень существенную рекреационную нагрузку, в бассейне р. М. Алматинка, включая окрестности пер. Талгарский проживает 66,0-71,0% от всех серых сурков на участке. За период наблюдения в границах обследованной территории учитыва-

лось от 450 до 520 сурков [4], к осени 2020 г. на ней проживало 630-670 особей.

На энзоотичной по чуме территории кетменьской популяции, граничащей на востоке с кунгей-заилийской, на высотах около 2000 м н. у. м. сохранилось традиционное животноводство и вдоль рек и ручьев через 400-600 м располагаются чабанские стоянки со скотом и собаками. Браконьерская добыча сурков чабанами ведётся постоянно (в основном, из-за целебного жира и на прокорм собакам), сурки там очень пугливы, но их численность относительно стабильна [12]. Можно предположить, что фактор беспокойства под влиянием мощного антропогенного воздействия отрицательно повлияет на качественные характеристики популяций сурков, однако, это не вполне верно. Наблюдения доказали, что по основным показателям, характеризующим физиологическое состояние популяции в период подготовки к спячке, сурки с южных склонов Кетменя, активно используемых животноводами, не имеют существенных отклонений по сравнению с аналогичными параметрами зверьков из более безлюдных популяций Центрального Тянь-Шаня [23, 24]. Зарубежные исследования также это подтверждают. «Оценка уровня выживаемости у сурков, обитающих на территории с высоким уровнем посещаемости оказалась немного выше, чем у сурков, обитающих на непосещаемых территориях, что соответствует гипотезе о том, что они регулируют своё поведение, приспосабливаясь к существующему уровню туризма без демографического

ущерба [25]. Привязанность сурков к пастбищам и их связь с копытными известны зоологам давно [7, 19]. Умеренное отгонное пастбищное животноводство оказывает скорее благоприятное воздействие на жизнь грызунов, условия становятся неблагоприятными лишь при перевыпасе, который приводит к истощению пастбищ и их вырождению [2]. Оптимальные условия для сурков создаёт выпас домашних животных [26]. Наиболее детально эта проблема изучена на примере степного сурка. Так, по мнению В.В. Колесникова, «сокращение количества колоний байбака на юге Ульяновской области произошло вследствие сокращения количества выпасаемого скота с 1990 до 2004 гг. в 14 раз» [27]. Одним из ключевых факторов экологической ниши сурков (*Marmota*) является их биотопическая приуроченность к местам выпаса копытных млекопитающих, диких или домашних. «Копытные, образуя с сурками коадаптивный комплекс, представляют собой по отношению к ним селективную силу или силу отбора» [28]. Сохранившиеся следы свидетельствуют, что интенсивность выпаса в прошлом была несравненно выше, чем сейчас, когда на этой территории выпасается незначительное количество лошадей и крупного рогатого скота. Выпас скота в субальпийской зоне наблюдаемого участка в своё время оказал благоприятное влияние на условия жизнедеятельности сурков. Сейчас летом высота растительного покрова в подходящих для их проживания местах составляет не менее 1,0-1,5 м, что и служит основной, но не единственной причиной их отсутствия. Ярким доказательством этого, служит заброшенное поселение в бассейне р. Бутаковка. Как в низкогорье, так и в альпийской зоне действует комплекс абиотических и биотических факторов. В верховьях Кокжайлау почти постоянно пасётся небольшой табун лошадей (15-17 голов), что способствует проживанию сурков в субальпийском поясе, но обитаемое поселение осталось только в верховьях верховья р. Бедельбай (р. Батарейка) на высотах от 2450 до 2600 м. Максимальная численность зверьков наблюдалась в 2016 г., когда зимовка происходила в 3 бутанах (рисунок 1). В этом же году восточнее и сев.-вост, в окр. перевалов Сарысай и Бутаковский произошла депрессия и фиксировались только одиночные обитаемые участки (рисунок 3). К настоящему времени на сев.-востоке участка сурков не только восстановил численность, но и осваивает заброшенные территории, а на Кокжайлау численность снизилась и норы, расположенные западнее (2400, 2430 и 2460 м н. у. м.) за-

плыли (рисунки 2 и 4). Обязательным условием существования стабильных поселений сурков на участке ниже 2800 м н. у. м. являются крупнокаменистые осыпи. Исключение составляет только поселение на Кокжайлау, но там сейчас зверьки зимуют в одном месте – у крутого южного склона излучины р. Бедельбай, часто протаивавшего даже зимой (рисунок 6).



**Рисунок 6** – Расчищенный после зимовки выход (Кокжайлау (2460 м н. у. м., 21.03.2019 г.) (фото В.Г. Мека-Меченко)

В верховьях р. Горельник и р. Казахкызы (р. Казахка) численность сурков возрастает, но только за счёт новых бутанов, образованных в границах поселений. Заплывшие бутаны, находящиеся севернее поселения р. Горельник на высоте 2800 и 2900 м и западнее поселения р. Казахкызы на высоте 3050-3090 м зверьками не осваиваются (рисунок 4), что можно объяснить биотическими и климатическими факторами. В пределах обследуемого участка серые сурки могут контактировать между собой и сходным поселением зверька в верховьях р. Кумбель на западе, только на востоке контакт с правым склоном р. Лев. Талгар маловероятен.

Выход серых сурков на поверхность после спячки происходил с середины марта до 2 декады мая и зависел от высоты, погодных условий, расположения бутанов и т. д. Обычно, на всех высотах, бутан расчищается через снег и в первый день зверьки его не покидают или держатся рядом. Только на следующий день они начинают перебираться на протаявший склон, где имеются норы или каменные осыпи (рисунки 6, 7), но на ночёвку всегда возвращаются. Снегопады могут продолжаться более месяца после первого выхода, норы будут расчищаться по-прежнему, но активность сурков сильно возрастает, следы на снегу фиксировались до 900 м.





**Рисунок 7** – а) Нижний обитаемый бутан на левом берегу р. М. Алматинка (2600 м н. у. м., 13.04.19), б) Молодой перезимовавший серый сурок из этого бутана в крупнокаменистой осыпи (13.04.2019 г.) а) август 2016 г., б) август 2020 г. (фото В.Г. Мека-Меченко)

Сроки выхода не всегда зависят от высоты, бывает, что на хорошо протаявших склонах ниже 3000 м н. у. м., сурки появляются на поверхности только в 1 декаде мая (рисунок

8). Расселение происходило с начала июня до середины августа, но наиболее интенсивное проходило со второй декады июня по 2 декаду июля.



**Рисунок 8** – а) Нерасчищенная зимовочная нора на обитаемом бутане 200 м ю-в. перевала Бутаковский (2820 м н. у. м., 02.05.2014 г.), б) Та же, нора расчищенная сурками, после перезимовки (07.05.2014 г.) (фото В.Г. Мека-Меченко)

Залегание сурков в спячку происходит в 3 декаде августа на высоте до 3000 м н. у. м. На высоте 3000-3200 м в 1 декаде сентября выходят на поверхность 30,0-40,0% взрослых зверьков, но молодые уже отсутствуют, хотя выше они ещё активны. К середине 2 декады сентября активны 20,0-25,0% взрослых зверьков выше 3200 м н. у. м., а к середине 3 декады сентября залегают в спячку последние одиночные зверьки.

### Заключение

Антропогенный фактор и рекреационная нагрузка, несомненно, играют роль, но их значение бывает преувеличено зоологами. Исключая хозяйственное использование территории, приводимое к изменению среды обитания, если люди специально не преследуют сурков, они вполне мирно уживаются с человеком. Отсут-

ствие сурка в низкогорьях и снижение его численности в субальпийском поясе обследуемой территории связано, в первую, но не единственную очередь, с сокращением выпаса скота, которое привело к увеличению высоты и густоты травостоя, а в альпийской зоне действует комплекс абиотических и биотических факторов. Несмотря на значительное повышение численности сурков в последние годы, эпидемическая опасность участка сейчас минимальна, но санитарно-просветительную работу проводить желательнее.

### Конфликт интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Источник финансирования

Работа выполнена по НТП ИРН BR11065207 «Разработка и научное обоснование технологий общественного здравоохранения, биологической безопасности для воздействия на профилактику опасных инфекционных заболеваний»

### Литература

- 1 Brandler O.V. Phylogenetic links in the genus *Marmota* and history of the establishment of its range // Proceedings of firth International conference on Genus *Marmota*. Tashkent, 2007, pp. 16-23.
- 2 Бибииков Д.И., Берендяев С.А. Серый сурок // Сурки, распространение, экология. – М.: Изд. Наука, 1978. – С. 39-78.
- 3 Мека-Меченко В.Г. Мониторинг серого сурка – *Marmota baibacina* на ограниченном участке Заилийского Алатау // Известия НАН Республики Казахстан. Серия биолог. и мед. – Алматы, 2017. – Вып. 5 (323). – С. 200-208.
- 4 Meка-Mechenko V. G., Pole S.B. Monitoring of Gray Marmot (*Marmota baibacina*) in A Zone of Active Tourism in Zailiyskiy Alatau // The 7th International conference on the Genus *Marmota* «Marmots of Old and New Worlds». 13-17 august 2018, Ulaanbaatar, Mongolia. Ulaanbaatar. 2018. – P. 235-245.
- 5 Айкимбаев А.М., Литвок Я.И., Шварц А.В. и др. // Руководство по эпидемиологическому надзору в горных очагах чумы Тянь-Шаня и Алая. – Бишкек-Алма-Ата, 1991. – 124 с.
- 6 Odum Yu. Fundamentals of Ecology (with H. Odum). Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1953. – 383 p.
- 7 Бибииков Д.И. Горные сурки Средней Азии и Казахстана. 1967. // М.: Наука. – 199 с.
- 8 Barash D.P. Marmots. Social Behavior and Ecology // Stanford University Press. 1989. – 360 p.
- 9 Atshabar.B.B, Burdelov L.A., Ageev V.S. et al. Atlas of distribution of Especially bacterial and viral zoonotic Infections in the Republic of Kazakhstan // Almaty, 2010. – 121 p. (Russ., Engl., Kaz.).
- 10 Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях / Под ред. д.м.н., проф. А. Ю. Поповой и д.м.н., проф. В. В. Кутырева – Ижевск: изд-во ООО «Принт», 2018. – 336 с.
- 11 Ибрагимов Э.Ш. Некоторые итоги неспецифической профилактики чумы в высокогорных очагах Кыргызской Республики // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – Алматы, 2014. – Вып. 2 (30). – С. 27-31.
- 12 Наурузбаев Е.О., Бердибеков А.Т., Силантьев В.В. Выявление эпизоотии чумы на Каркаринской потенциально-очаговой территории // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – Алматы, 2016. – Вып. 1 (32). – С.88-90.
- 13 Аубакиров С.А., Бурделов А.С., Степанов В.И. О поисках и изучении новых природных очагов чумы // Организация эпиднадзора при чуме и меры ее профилактики: Матер. межгосудар. научно-практ. конф. – Ч. III. – Алма-Ата, 1992. – С. 186-189.
- 14 Зверянский Г.И., Касенова А.К., Махнин Б.В. и др. Опыт эпизоотологического обследования потенциально очагового по чуме северного склона Заилийского Алатау // Материалы науч. конф. «Экологич. аспекты эпизоотол. и эпидемиол. чумы и др. особо опасных инф.» (4-5 сент. 1996 г., г. Талдыкорган). – Алматы, 1996. – С. 80-81.
- 15 Pole S.B., Sapoznikov V.I., Bezverkhni A.V. et al. (1996). Perspective of discovtry of coumpaund of plaque foci (*Marmot-Ground Squirrel* and *Marmot-Vole*) on periphery areas of Tian Shan. // Biodiversity in Marmots. Publication of the International Marmot Network. – Moscow, Lyon, pp. 109-111.
- 16 Бибииков Д.И., Семёнова Н.И., Кузин И.П. Каменка-плясунья в Тянь-Шане // Материалы VII науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1971. – С. 516-518.
- 17 Бибииков Д.И. Миграции каменки-плясуньи (*Oenanthe isabellina*) в СССР и ее вероятная роль в переносе возбудителя чумы // Тез. докл. 18 междунар. орнит. конгр. – М., 1982. – С. 192.
- 18 Бурделов Л.А. Дискуссии в эпизоотологии чумы: причины возникновения, методы ведения и основные последствия // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – Алматы, 2016. – Вып. 1. – С. 3-24.
- 19 Капитонов В.И. Очерк о серых сурках // Млекопитающие Казахстана. – Алма-Ата: Наука, 1969. – Т. 1. – С. 267-336.
- 20 Грачёв А.А., Грачёв А.В., Балатаев А.О. О территориальном и биотопическом распределении серого сурка (*Marmota baibacina*) в центральной части северного макросклона хребта Иле (Заилийского) Алатау. // Современные проблемы охот. хозяйства Казахстана и сопредельных стран: Матер. Междунар. научно-практ. конф., Алматы, 11-12 марта 2014 г. – Алматы, 2014. – С. 135-137.



- 21 Ташибаев Е.С., Касабеков Б.Б., Магда И.Н. Оценка влияния антропогенного фактора на фауну диких млекопитающих Заилийского (Илейского) Алатау и прилегающей равнинной части в пойме р. Тургень. // Материалы Междунар. научной конфер. «Животный мир Казахстана и сопредельных территорий». Алма-Ата, 2012. – С. 316-318.
- 22 Вакуленко-Снегиревская Е.М. Краткий обзор млекопитающих бассейна р. Малой Алматинки Алматинского государственного заповедника // Труды Алматинского госзаповедника. – Алма-Ата, 1940. – Вып. 2. – С. 1-18.
- 23 Мырзабеков Ж.М., Поле С.Б. Экологическая характеристика кетменьской популяции серого сурка // Охрана, раз. использование и экология сурков: Материалы Всесоюз. совещ. – М., 1983. – С. 74-76.
- 24 Pole S.B. Ecological and morphophysiological heterogeneity of grey marmot population in central Tien-Shan // Proceed. II Intern. conf. of marmots. France. 1996. pp. 199-202.
- 25 Cox Griffin S., Taper M.L., Griffin P.C. et al. The Effects of Tourist pressure on the behavior and Demography Olympic Marmots. // Proceed. Fifth Intern. conf. of marmots. Tashkent, 2005, p. – 36.
- 26 Nikol'ski V.I., Ulak A. The ecology of the Himalayan marmot, *Marmota himalayana*, Hodson (1841), in Nepal // Marmots of Eurasia: origin and the current state. Tashkent, 2007, pp. 101-104.
- 27 Kolesnikov V.V. On minimum vital population // Marmots of Eurasia: origin and the current state. Tashkent, 2007, pp. 57-61.
- 28 Карпукхина Е.И., Орлова В.С., Никольский А.А. Копытные млекопитающие как селективная сила по отношению к суркам (*Marmota*) // Прошлое, настоящее и будущее сурков Евразии. Москва. АБФ Медиа, 2015– С. 52-62.

### References

- 1 Aikimbayev A.M., Litvok Ya.I., Schwartz A.V. and others // Guidelines for epidemiological surveillance in the mountain plague foci of the Tien Shan and Alay. – Bishkek-Alma-Ata, 1991. – 124 p.
- 2 Atshabar.B.B, Burdelov L.A., Ageev V.S. et al. (2010) Atlas of distribution of Especially bacterial and viral zoonotic Infections in the Republic of Kazakhstan. Almaty, 121 p. (Russ., Engl., Kaz.).
- 3 Aubakirov S.A., Burdelov A.S., Stepanov V.I. (1992) About search and studying of new natural foci of plague. Organization of epidemiological surveillance at plague and measures of its prevention: Mater. interstate. scientific practice. Conf. Part III, Alma-Ata, pp. 186-189.
- 4 Barash D.P. (1989) Marmots. Social Behavior and Ecology. Stanford University Press, 360 p.
- 5 Bibikov D.I. (1967) Mountain Marmots of Central Asia and Kazakhstan. M.: Publishing House “Nauka”, 199 p.
- 6 Bibikov D.I. (1982) Migration of the kamenka-dancer (*Oenanthe isabellina*) in the USSR and its probable role in the transfer of the plague pathogen. Tez. report 18 int. ornit. Congr. M., p. 192.
- 7 Bibikov D.I., Berendyaev S.A. (1978) Grey marmot. Marmots, distribution, ecology. -M.: Publishing House “Nauka”, pp. 39-78.
- 8 Bibikov D.I., Cemenova N.I., Kuzin I.P. (1971) Kamenka-dancer in Tien-Shan. Mater. VII scientific confer. anti-plague the organization Central Asia and Kazakhstan. Alma-Ata, pp. 516-518.
- 9 Brandler O.V. (2007) Phylogenetic links in the genus *Marmota* and history of the establishment of its range // Proceedings of fifth International conference on Genus *Marmota*. Tashkent, pp. 16-23.
- 10 Burdelov L.A. (2016). Discussions in plague epizootology: causes, methods of management and main consequences. Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan. Almaty, Iss. 1, pp. 3-24.
- 11 Cox Griffin S., Taper M.L., Griffin P.C. et al. (2005) The Effects of Tourist pressure on the behavior and Demography Olympic Marmots. // Proceed. Fifth Intern. conf. of marmots. Tashkent, p. – 36.
- 12 Ensuring epidemiological well-being in natural foci of plague on the territory of the CIS countries and Mongolia in modern conditions / Ed. MD, prof. A. Yu. Popova and Doctor of Medical Sciences, Prof. V.V. Kutyreva. Izhevsk: Publishing House of OOO Print, 2018, 336 p.
- 13 Grachev A.A., Grachev A.V., Bolataev A.O. (2014) On spatial and habitat distribution of gray marmot (*Marmota baibacina*) in the Central part of the Northern macroslope of the ridge Ile (Zailiyskiy) Alatau. Modern problems of hunting economy of Kazakhstan and neighboring countries: Mater. Internation. scientific practice. confer., Almaty, 11-12 March 2014, pp.135-137.
- 14 Ibragimov E.Sh. (2014) Some results of non-specific prophylaxis (Non-Specific Prophylaxis) of plague in high mountain foci of the Kyrgyz Republic. Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan. Almaty, Issue, 2 (30), pp. 27-31.
- 15 Kapitonov V.I. (1969) Essay on the gray marmot. Mammals of Kazakhstan. Rodents (*Marmota* and ground squirrels). Pub. H. “Nauka”, vol. 1, Alma-Ata, pp. 267-336.
- 16 Карпукхина Е.И., Орлова В.С., Никольский А. А. (2015) Hoofed mammals as a selective force in relation to the marmot (*Marmota*). Past, present and future of marmots of Eurasia. ABF Media, Moscow, pp. 52-62.
- 17 Kolesnikov V.V. (2007) On minimum vital population. Marmots of Eurasia: origin and the current state. Tashkent, pp. 57-61.
- 18 Meka-Mechenko V.G. (2017) Monitoring of Gray Marmot – *Marmota baibacina* of the Limited Side in Zailiyskiy Alatau // Bulletin of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Biologist and med. series Almaty, Vol. 5 (323), pp. 200-208.
- 19 Meka-Mechenko V.G., Pole S.B. (2018) Monitoring of Gray Marmot (*Marmota baibacina*) in A Zone of Active Tourism in Zailiyskiy Alatau. The 7th International conference on the Genus *Marmota* «Marmots of Old and New Worlds». 13-17 august 2018, Ulaanbaatar, Mongolia. Ulaanbaatar, 2018, pp. 235-245.

- 20 Myrzabekov Zh.M., Pole S.B. (1983) Ecological characteristics of the Ketmen population of the gray marmot. Protection, rac. use and ecology of marmots: Proceedings of the All-Union. meeting. M., pp. 74-76.
- 21 Nauruzbaev E.O., Berdibekov A.T., Silantsev V.V. (2016) Detection of plague epizootics in the Karkarinsky potentially focal area. Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan. Almaty, Vol. 1 (32), pp. 88-90.
- 22 Nikol'ski V.I., Ulak A. (2007) The ecology of the Himalayan marmot, *Marmota himalayana*, Hodson (1841), in Nepal. Marmots of Eurasia: origin and the current. Tashkent, 2007, pp. 101-104.
- 23 Odum Yu. (1953) Fundamentals of Ecology (with H. Odum). Philadelphia: W. B. Saunders Company, 383 p.
- 24 Pole S.B. (1996) Ecological and morphophysiological heterogeneity of grey marmot population in central Tien-Shan// Proceed. II Intern. conf. of marmots. France, pp. 199-202.
- 25 Pole S.B., Sapozhnikov V.I., Bezverkhni A.V. et al. (1996). Perspective of discovery of compound of plague foci (Marmot-Ground Squirrel and Marmot-Vole) on periphery areas of Tian Shan. Biodiversity in Marmots. Publication of the International Marmot Network. Moscow, Lyon, pp. 109-111.
- 26 State catalog of geographical names of the Republic of Kazakhstan. Vol. 4. Alm. region. Almaty, 2005, 392 p.
- 27 Tashibaev E.S., Karabekov B.B., Magda I.N. (2012) Assessment of the impact of anthropogenic factors on fauna of wild mammals of Zailiyskiy (Ile) Alatau and the adjacent flat part in the floodplain of Turgen. Abstracts of the Intern. scientific confer. "The animal of Kazakhstan and adjacent territories". Almaty, pp. 316-318.
- 28 Vakulenko-Snegirevskie E.M. (1940) Brief review of the mammals of the river Small Almatinka, Almaty state nature reserve. Proceedings of the Almaty state reserve. Alma-Ata, vol. 2, pp. 1-18.

У.Ч. Чоманов , Г.С. Кененбай\* ,  
Б.Б. Омиржанова , А.Н. Татиева 

ЖШС «Қазақ қайта өңдеу және тағам өнеркәсіптері  
ғылыми-зерттеу институты», Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: [gkenenbay@mail.ru](mailto:gkenenbay@mail.ru)

## ІРІ ҚАРА МАЛ ӨТІНІҢ ХИМИЯ-БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІ

Мақалада медицина саласында, ауылшаруашылық жануарларының эндокринді-ферменттік және арнайы шикізатын дәрілік мақсатта қолдануға болатын, көптеген пайдаланылмаған қорлары көп екені туралы айтылып, ірі қара малдың өтін өңдеудің технологияларына талдау жүргізілді. Жабайы жануарлардың өтінде биологиялық белсенді заттардың кең ауқымы бар екендігі көне заманнан бері белгілі.

Фармакологияның дамуы, әртүрлі емдік препараттарды әзірлеу үшін, эндокринді-ферменттік және арнайы шикізаттың барлық пайдалы қасиеттерін толығымен ашуға мүмкіндік береді.

Әлемдік нарықта ірі қара мал өтіне сұраныс өте жоғары. Сондықтан, медициналық және ветеринариялық препараттарды өндіруге арналған эндокринді-ферменттік және арнайы шикізаттарды жинау және өңдеу тиімді бағыттардың бірі болып табылады. Қазіргі уақытта Қазақстанда эндокринді-ферменттік және арнайы шикізат өңделмейді. Сол себепті, осы мақалада ірі қара малды сою кезінде алынатын, өтті өңдеу жұмыстары және қайта өңдеу саласындағы негізгі бағыттар, оның сапасын жақсартатын, өнімнің сапа көрсеткіштерін ұзақ уақыт сақтау технологияларын жасау жолдары қарастырылған. Өтті ұзақ уақыт сақтау жолдарының ең тиімді жолы ол консервілеу, яғни қоюландыру процесі. Малдың жасына және жынысына байланысты, өт қою немесе сұйық болып келеді. Сондықтан, қоюландыру процесі 12-15 сағат аралығында өтті. Осы нәтижеге байланысты қоюландыру процесінің оңтайлы параметрлері анықталды.

Зеттеу барысында, өттің физикалық, химия-биологиялық құрамы, микробиологиялық көрсеткіштері анықталып, сақтау мерзімі белгіленді. Мақалада өттің зерттеу нәтижелері ұсынылды.

**Түйін сөздер:** ірі қара мал, өт қабы, өт, консервілеу, химия-биологиялық көрсеткіштері.

U.Ch. Chomanov, G.S. Kenenbay\*, B.B. Omirzhanova, A.N.Tatiyeva  
LLP «Kazakh research institute of processing and food industry», Kazakhstan, Almaty  
\*e-mail: [gkenenbay@mail.ru](mailto:gkenenbay@mail.ru)

### Prospects and possibilities for processing endocrine-enzymed and special raw materials

The article talks about a large number of unused resources in the field of medicine, where endocrine-enzyme and special raw materials of farm animals can be used for medicinal purposes, an analysis of technologies for processing bile of cattle is carried out. The fact that the bile of wild animals contains a wide range of biologically active substances has been known since ancient times.

The development of pharmacology makes it possible to fully reveal all the beneficial properties of endocrine-enzyme and special raw materials for the development of various therapeutic drugs.

The demand for cattle on the world market is very high. Therefore, one of the effective directions is the collection and processing of endocrine-enzyme and special raw materials for the production of medical and veterinary drugs. Currently, endocrine-enzyme and special raw materials are not processed in Kazakhstan. Therefore, this article discusses the main directions in the field of bile processing and processing of meat obtained during slaughter of cattle, ways to develop technologies for long-term preservation of product quality indicators that improve its quality. The most effective way of long-term storage is canning, i.e. the process of thickening. Depending on the age and sex of the animal, the bile can be thick or liquid. Therefore, the thickening process took place within 12-15 hours. Depending on this result, the optimal parameters of the thickening process were determined.

In the course of the study, the physical, chemical and biological composition, microbiological parameters of bile were determined, and storage periods were established. The article presents the results of the study of bile.

**Key words:** cattle, gallbladder, bile, canning, chemistry-biological indicators.

У.Ч. Чоманов, Г.С. Кененбай, Б.Б. Омиржанова, А.Н. Татиева  
ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей  
и пищевой промышленности», Казахстан, г. Алматы  
\*e-mail: gkenenbay@mail.ru

### Химия-биологические свойства желчи крупного рогатого скота

В статье говорится о большом количестве неиспользованных ресурсов в области медицины, где эндокринно-ферментное и специальное сырье сельскохозяйственных животных может быть использовано в лечебных целях, проведен анализ технологий переработки желчи крупного рогатого скота. О том, что в желчи диких животных содержится широкий спектр биологически активных веществ, известно с древних времен.

Развитие фармакологии позволяет в полной мере раскрыть все полезные свойства эндокринно-ферментного и специального сырья для разработки различных лечебных препаратов.

Спрос на крупный рогатый скот на мировом рынке очень высок. Поэтому одним из эффективных направлений является сбор и переработка эндокринно-ферментного и специального сырья для производства медицинских и ветеринарных препаратов. В настоящее время в Казахстане не обрабатывается эндокринно-ферментное и специальное сырье. Поэтому в данной статье рассмотрены основные направления в области переработки желчи и переработки мяса, получаемого при убое крупного рогатого скота, пути разработки технологий длительного сохранения показателей качества продукции, улучшающих ее качество. Наиболее эффективным способом длительного хранения является консервирование, т. е. процесс загустения. В зависимости от возраста и пола животного желчь бывает густой или жидкой. Поэтому процесс сгущения проходил в пределах 12-15 часов. В зависимости от этого результата были определены оптимальные параметры процесса сгущения.

В ходе исследования были определены физический, химия-биологический состав, микробиологические показатели желчи, установлены сроки хранения. В статье представлены результаты исследования желчи.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, желчный пузырь, желчь, консервирование, химия-биологические показатели.

### Кіріспе

Аграрлық сектордағы инновациялық үдеріс дегеніміз – бұл техникалық және технологиялық идеяларды жаңа технологияларға немесе оның жекелеген компоненттеріне айналдыру. Ауылшаруашылық өндірісінің инновациялық дамуы – бұл экономиканың барлық салаларында жетістікке жетудің маңызды факторы болып табылады.

Қазіргі экономикалық жағдайда өндірілетін өнім түрлерінің кеңеюі және олардың сапасының артуы жаңа технологияларды өндіріске енгізу арқылы ғана мүмкін болады (Толысбаев Б.С. және т.б., 2019).

Сондықтан да, бүгінгі күні еліміздің ғалымдарының басты міндеті – осы мәселелерді жылдам шешуге ықпал ететін инновациялық жобалар дайындау. Бұл жобалардың басты мақсаты – Қазақстан Республикасының агроөнеркәсіптік кешені субъектілерінің бәсекеге қабілеттілігін арттыру және қайта өңдеу өндірісін дамытуға бағыттау үшін жағдай жасау.

Қазіргі уақытта мал шаруашылығынан алынатын, шикізат өнімдерін терең өңдеу пробле-

масы бар және өзінің шешімін талап етеді. Ол экологиялық және экономикалық аспектілерді қамтиды. Зерттеулердің нәтижесі бойынша, ТМД мен шет елдерде өт пен өт тасын өңдеудің ауқымы жеткіліксіз екендігі анықталды. Бүгінгі күні Ресейде арнайы шикізатпен бірқатар ірі компаниялар ғана жұмыс істейді. Беларусьиялық кәсіпорындардың бірі – «БелАсептика» ЖАҚ, ферментті препараттар дайындайтын және өндіретін «ШАКО» «Самсон Мед» осы инновациялық жобаны өз мойындарына алды. Ал Беларусьиялық «Belmedpreparaty» RUE өтті терең өңдеумен айналысады.

Сойылған малдың ішкі ағзасынан алынған шикізатты үш топқа бөлуге болады: эндокриндік, ферменттік, арнайы шикізат.

◆ Эндокриндік шикізатқа, қан мен лимфаға бөлінетін сөлдің шығу каналдары жоқ бездер, сондай-ақ дене препараттары үшін қолданылатын қос секреция бездері, гипоталамус, қалқанша без, ұйқы безі және асқазан бездері, бүйрек үсті бездері және сойылған жануарлардың жыныстық жетілген ерлерінің ұрықтары кіреді.

◆ Ферменттік шикізат бұл – ірі қара малдың ішектерінің, шошқа асқазанының, қой мен



ешкінің, ірі қара малдың және шошқалардың шырышты қабығы, қарын асты безі және жыныстық жетілген аналық малдың аналық безі.

◆ Арнайы шикізатқа – қан, сүт бездері, өт, өт тастары, өкпе және арқа, бауыр, ұрық, бүйрек, көкбауыр, көз, шеміршек, ірі қара малдың шырышты қабаты, трахея, жүрек және тамыр бездері және шошқаның он екі елі ішегі жатады.

Эндокринді-ферменттік және арнайы шикізатты қайта өңдеу агроөнеркәсіп кешенін дамытудың маңызды бағыттарының бірі болып табылады. Бұл сала бізге әртүрлі өндірістік салаларда қолдануға болатын, көптеген өнімдер түрлерін шығаруға мүмкіндік береді.

Ірі қара малды сою кезінде алынатын іш майы, ішек және арнайы шикізат пайдалы заттардың бағалы көзі болып табылады, сондықтан оны емдік препараттар және техникалық өнімдер шығару үшін пайдаланады. Медицинада бұл препараттар бірқатар аурулардың алдын-алу және емдеу үшін қолданылады (Лисицын А.Б. и др., 2015). Медициналық өнеркәсіптің шетелдік кәсіпорындары (Санофи Индия Лимитед, Индия) ірі қара мен шошқа өтінен хологон, аллохол, билиарин препараттарын шығарады. Бұл панзинорм, фесталь және котазим-форте сияқты асқазанның күрделі препараттарының бөлігі.

Жануарлар мен адам ағзасы үшін өттің жетекші рөлі көптеген тәжірибелер мен клиникалық зерттеулермен дәлелденді. Сондықтан гепатобилиарлық жүйе ауруларын емдеу үшін, өт негізіндегі препараттарды қолдану өзекті болып қала береді. Осы уақытқа дейін ірі қара мен аюдың өті көптеген препараттардың негізгі шикізаты ретінде қолданылады. Ресей аумағында өттің негізінде екі дәрілік препарат әзірленді – аллохол және холензим (Машковский М.Д., 1993).

Холензим, аллохол – бұлар ірі қара малдың немесе шошқалардың өтінен, сондай-ақ олардың аш ішектің шырышты қабығының ұйқы безінен алынған және түйіршіктелген таблетка түрінде шығарылатын ферменттік препарат. Олар бауыр, асқазан-ішек жолдары ауруларын емдеу кезінде қолданылады. Гепатобилиарлық жүйенің көптеген ауруларының хронизациясы өттің реологиялық қасиеттерінің өзгеруіне байланысты болады (Rodkiewicz S.M. et al. 1979, Everson G.T. et al. 1980, Dodds W.J. et al. 1985, Gill P.T. et al. 1985).

Медициналық тұрғыда қарағанда малдың ішкі органдарында түрлі витаминдер мен макро – микро элементтер көп болатындығы ғылыми дәлелденген.

Олардың әсерінің тиімділігі гармон мен ферменттердің жетіспейтін мөлшерін, сондай-ақ союға арналған жануарлардың мүшелері мен ұлпаларында болатын басқа биологиялық белсенді заттарды енгізумен байланысты. Ішектің құрамында белоктар 9-10%, майлар – 1-2%, минералды заттар – 1%, су – 85-88% кіреді. Сонымен қатар ішектерде ферменттер мен витаминдер бар (Лисицын А.Б. и др., 2015). Арнайы шикізат белгілі бір деңгейде өзінің құрамындағы биологиялық белсенді заттардың тұрақсыздығымен ерекшеленеді. Осыған байланысты оны жинауға, сақтауға, өңдеу мен тасымалдауға ерекше талаптар қойылады (Лисицын А.Б. и др. 2015, Boyer J.L. et al. 2013).

Дәстүр бойынша өт қышқылдары, өт ағынының белсенділігін арттырады және ішектегі майдың қорытылуы мен сіңуіне көмектеседі деп есептелінеді (Hofmann A.F. et al. 2014, Sharma R. et al. 2011).

Өттің ерекше компоненттері – өт пигменттері мен өт қышқылдары. Онда холестерин, лецитин, майлар, минералды тұздар, май қышқылдарының тұздары, несепнәр бар. Өт пигменттері – биливердин, билирубин, уробилин, оған белгілі бір түс береді, жұптасқан өт қышқылдары – таурохол (20%) және гликохол (80%). Өт құрамында май және май тәрізді заттар – копростериндер бар.

Соңғы онжылдықта, ӨҚ (өт қышқылы) химия ғылымының әр түрлі салаларын – дәрілік химия, молекулалық химия зерттеушілерін назарына аударды. ӨҚ, нағыз табиғи биологиялық белсенділіктің арқасында, физикалық-химиялық қасиеттері, құрылымдық ерекшеліктері, бағасы жағынан – химиялық түрлендірулер үшін өте қолайлы материал (Lin et al., 2018).

Өт қышқылдары – бұл бауырда синтезделетін және ағзадан өт арқылы шығарылатын көміртект атомдарының туындылар тобы. Өт қышқылдары адам мен жануарлардың бауырында холестериннен пайда болып, өтпен бірге ұлтабарға өтеді. Химиялық құрамы бойынша өт қышқылдары – хола қышқылының  $C_{23}H_{39}COOH$  туындалары. Өт қышқылының адам мен жануарлар организмнің майды қорытып сіңірудегі маңызы зор. Өт қышқылдары жануарлар өтінен алынып, олардан дәрі-дәрмек жасалады (Serfaty L. et al. 2012, Pat. 2011, Eggert T. et al. 2014). Өт құрамында холе, хенодезоксихол, дезоксихол қышқылдары көп мөлшерде жеткілікті. Қол жетімді стероидтардан дезоксихоле, литохоле қышқылдары синтетикалық әдістермен жасалды (Salvador J.A.R. et al. 2013, Blanchet M. et al. 2018).

Өт қышқылының биологиялық белсенділігінің спектрі жеткілікті болғандықтан бактерияға, микробқа, ісік ауруларына қарсы әрекет ете алады.

Өт қышқылдары және олардың тұздары табиғи белсенді заттар болып табылады. Сонымен қатар өттегі натрий тұздары фармацевтикалық практикада, биологиялық орта ретінде кеңінен қолданылады. Өттің негізгі компоненттері өт қышқылдарының тұздары (өттің құрғақ қалдықтарының 87-97% -ы) болғандықтан, оларды өттен бөліп, қолданған жөн болар еді. Алайда, өт қышқылдарын өндіру үшін арнайы жабдық қажет, бұл өттің құнын едәуір арттырады. Өттің басқа компоненттерінің мөлшері аз болғандықтан (май қышқылдары, холестерин, лецитин, пигменттер және т.б.), көп жағдайда кері әсерін тигізбейді. Сондықтан, іс жүзінде өт қышқылдарының тазартылған препараттарымен қатар, табиғи өтті қолданады (Arlia-Ciommo A. et al. 2014, Kong W. et al. 2011, Gubitosi M. et al. 2014, Qiao Y. et al. 2011).

Эндокринді-ферменттік және арнайы шикізат – жануарлар ақуызының бағалы көзі, оның тапшылығы Қазақстан Республикасы тұрғындарының тамақтану рационында жыл сайын артып келеді. Алайда, Қазақстанда мұндай шикізатты пайдалану деңгейі өте төмен және оның көп бөлігі жойылады. Осыған орай жануарлардан алынатын өнімдерді қайта өңдеуді дамыту шаралары қарастырылған. Біздің мақсатымыз жаңа сойылған малдың өтін барлық санитарлық талаптарға сай жинап алып, халықаралық стандартқа сай дайындалған технология бойынша өндеп, фармацевтика саласындағы мамандарға дәрі-дәрмекке қоспа ретінде қосуға ұсыныс беру.

Эндокринді-ферменттік және арнайы шикізаттардың бастапқы биологиялық қасиеттерін сақтау үшін, жинау мен тазартудан кейін дереу консервілейді. Мұндай сақтау әдістері микробиологиялық процестердің дамуын болдырмау үшін және тіндердегі биохимиялық процестерді барынша тежеу үшін таңдалады. Сойылған малдың түріне және мақсатына байланысты өт әртүрлі жолмен консервіленуі мүмкін: мұздату, кептіру, қоюлату, сонымен қатар химиялық әдістермен.

### Зерттеу материалдары мен әдістері

«Қазақ қайта өңдеу және тағам өнеркәсіптері ғылыми-зерттеу институтының» зертханалық жағдайында, ірі қара малдың өтін консервілеу

және сақтау процестерін зерттеу бойынша жұмыс жүргізілді.

Зерттеу объектісі ретінде «А.А. Манашов» ЖШС-нан 48 және 24 айлық, 16 бас ірі қара малдың өті алынды. Өтті жинау үшін арнайы құрал-жабдықтар мен қондырғылар қолданылады.

Жиналған өт, зертханаға жеткізіліп, -12°C температурада сақталды. Бөлме температурасында өт ерітіліп, эксперименттік зерттеулер жүргізілді.

Эксперименттік зерттеулер шикізаттың және дайын өнімнің сипаттамаларын алуға мүмкіндік беретін келесі заманауи әдістерді қолдана отырып, ылғалды анықтау – Эвлас-2М құрылғысымен, тығыздығын анықтау – ареометрмен, тұтқырлықты анықтау вискозиметр Оствальдомен, судың белсенділігін анықтау AQUALAB құрылғысымен, белсенді қышқылды анықтау рН метрмен жүргізілді.

Өттің микробиологиялық көрсеткіштері МЕМСТ P51448-99 (ИСО3100-2-88) Ет және ет өнімдері. Микробиологиялық зерттеулер үшін сынама даярлау әдістеріне сәйкес белгіленген халықаралық стандарттарды қолдану арқылы анықталды.

МЕМСТ P54354-2011 Ет және ет өнімдері. Микробиологиялық зерттеулердің әдістері мен жалпы талаптарын қолдану арқылы анықталды.

Бактериялардың анықтамасы бойынша параграфтардың барлық нормалары мен талаптары сақталды, мысалы: іріктеу және дайындау (МЕМСТ 26668, МЕМСТ 26669 сәйкес); жабдықты, материалдарды, реактивтер мен қоректік орталарды пайдалану (МЕМСТ 10444.1, МЕМСТ 24104 бойынша; сынауға дайындық; сынау (МЕМСТ 26669, МЕМСТ 26670, МЕМСТ 30425 бойынша); нәтижелерді өңдеу.

### Зерттеу нәтижелері мен оларды талдау

Шығыс және Еуропа медицинасында ерте заманнан бері, жануарлардан алынатын өт, ұйқы безі және мүйіз қартаюға қарсы препараттарды дайындау үшін қолданылған. Бүгінде мұндай биологиялық өнімдер сау жануарлардың ағзалары мен ұлпаларынан өндіріледі. Шетелдік фармацевтикалық кәсіпорындар ірі қара мен шошқаның өтінен холенсим, хологон, аллохол, билярин препараттарын шығарады, бұл панзинорм, ас қорыту, фесталь және котазим-форте сияқты күрделі асқазан препараттарының құрамына кіреді.

Осы мақсатта ірі қара мал өтін өңдеп, фармацевтика саласына дәрі-дәрмекке қоспа ретінде қосуға ұсыныс жасауға мүмкіндік береді. Қоюландыру процесінің негізгі мақсаты ол, өттің құрамындағы биологиялық заттардың емдік қасиеттерін ұзақ уақыт сақтау.

Эксперименттік зерттеулер жүргізу үшін, ірі қара малдың өт қабы, барлық санитарлық талаптарды сақтай отырып жиналды. Қоюлан-

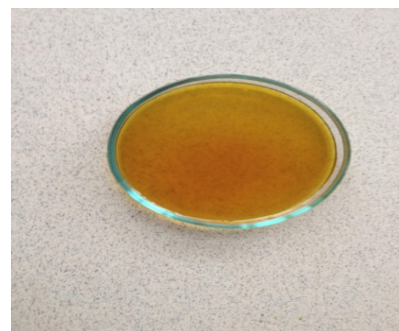
дыру процесінің негізгі мақсаты ол, өттің емдік қасиеттерін ұзақ уақыт сақтау. Ірі қара мал өтінің консистенциясы жасына, жынысына және жыл мезгілдеріне байланысты қою және сұйық болып келеді. Осыған байланысты қоюландыру уақыты 12-15 сағат аралығында өтті. Қоюландырылған сұйықтық стерильді құтыға құйылды. Ал, қоюландыру температурасы 60-70°C құрады.



1-сурет – Өт қабы



2-сурет – Өт қабы және өт



3-сурет – Табиғи өт

Зерттеулердің нәтижесінде консервілеу технологиялары жасалып, дайын болған өнімнің физика-химиялық көрсеткіштері анықталды. 70°C-та қоюландырылған өттің физика-химиялық көрсеткіштері 1-кестеде көрсетілген.

Осылайша жүргізілген зерттеулер нәтижесі бойынша (1-кесте), мал өтін қоюландыру процесі кезінде, оның ылғалдылығы, белсенді қышқылдық көрсеткіштері мен судың белсенділігі төмендейтіні, ал керісінше, өттің тығыздығы

мен тұтқырлығы жоғарлайтыны анықталды (Чоманов У.Ч., 2019).

Жануарлардың өтінде, сонымен қатар микроэлементтер мен әр түрлі биологиялық белсенді заттардың бар екендігі дәлелденген.

Зерттеулер АТУ АҚ «Тамақ өнімдерінің сапасы мен қауіпсіздігін бағалау жөніндегі ғылыми зертхана» сынақ зертханасында жүргізілді (2,3,4,5,6 кестелер). 2-кестеде өттің жалпы минералдық құрамын зерттеу нәтижелері көрсетілген.

**1-кесте** – 70°C –та өтті қоюландыру кезіндегі физика-химиялық көрсеткіштері

Көрсеткіштер	Өт, сағ				
	0	4	8	12	16
Белсенді қышқылдық, рН	7,8	7,6	7,41	7,32	7,20
Ылғал W, %	91,45	85,59	75,68	69,86	60,11
Тығыздық, ρ	1010	1017	1020	1026	1028
Тұтқырлық, ν	0,34	0,42	0,48	0,92	1,08
Судың белсенділігі, a <sub>w</sub>	0,9900	0,9952	0,9947	0,9637	0,9635

2-кесте – Өттің минералды құрамы

№	Компоненттер	Конц, мг/100г
1	K	4,84±0,63
2	Mg	0,813±0,08
3	Fe	3,83±0,06
4	Cu	0,218±0,05
5	Na, г/кг	18,1146±0,3079
6	Ca, %	0,69±0,01
7	Cl, мг/л	1875±25
8	P, %	0,94±0,01

2-кестеде, зерттеулер нәтижесінде өттің минералды құрамы 8 макро- және микроэлементтерден тұратын кешенмен ұсынылатындығы анықталды. Ірі қара малдың өтінде темірдің мөлшері көп – 3,83 мг/100 г, натрий – 18,114 г/кг және калий – 4,84 мг/100 г. 3-кестеде өттің витаминдік құрамы көрсетілген.

3-кесте – Өттің витаминдік құрамы

№	Компоненттер	Конц, мг/100г
1	B1 (тиамин хлориді)	0,0025±0,0005
2	B2 (рибофлавин)	0,016±0,007
3	B6 (пиридоксин)	0,011±0,002
4	C (аскорбин қышқылы)	0,14±0,05
5	B3 (пантотен қышқылы)	0,009±0,002
6	B5 (никотин қышқылы)	0,0014±0,0003
7	Bc (фолий қышқылы)	0,012±0,002

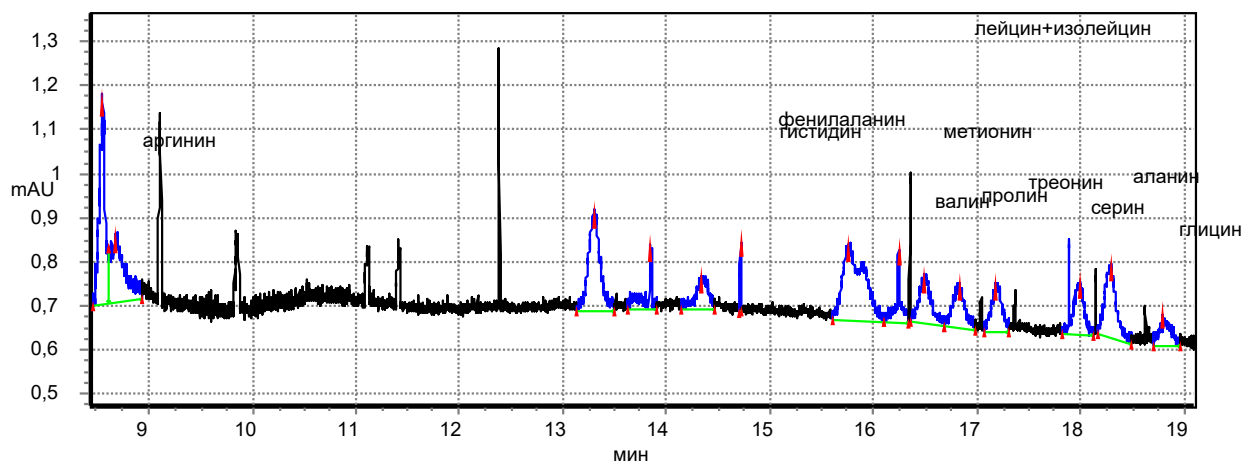
3-кесте нәтижесі бойынша, өт құрамындағы B тобындағы витаминдердің құрамында B1=0,0025±0,0005; B2=0,016±0,007; B6=0,011±0,002; Bc=0,012±0,002, ал C=0,14±0,05 тең екенін көрсетті. B2, B6, Bc көрсеткіштері жоғары деңгейде болды.

Зерттеу барысында, жануарлардың өтінде өт қышқылдарынан басқа көптеген аминқышқылдары бар екені анықталды. 4-кестеде өттің аминқышқылдық құрамы көрсетілген.

4-кестеде аминқышқылдарының құрамын зерттеу талдауы, массалық үлесі жағынан лейцин+изолейцин және лизин жоғары екенін көрсетті. 4-суретте аминқышқылдарының хроматограммасы көрсетілген.

4-кесте – Өттің аминқышқылдық құрамы

№	Компоненттер	Аминқышқылдарының массалық үлесі, %
1	Аргинин	0,067±0,027
2	Лизин	0,036±0,012
3	Тирозин	0,022±0,007
4	Фенилаланин	0,026±0,008
5	Гистидин	0,006±0,003
6	Лейцин+изолейцин	0,037±0,010
7	Метионин	0,016±0,006
8	Валин	0,023±0,009
9	Пролин	0,021±0,005
10	Треонин	0,021±0,009
11	Серин	0,023±0,006
12	Аланин	0,023±0,006
13	Глицин	0,007±0,002



4-сурет – Аминқышқылдарының хроматограммасы



Өттегі, органикалық қосылыстар құрамына кіретін май қышқылдарының массалық үлесі де орташа деңгейде екені анықталды. 5-кестеде өттегі май қышқылының құрамы көрсетілген.

5-кесте – Өттегі май қышқылының құрамы

№	Компоненттер	Май қышқылдарының массалық үлесі, %
1	Май қышқылы	2,314
2	Капрон қышқылы	88,90
3	Пентадецен қышқылының цис-10 метил эфирі	0,021
4	Пальмитол қышқылы	0,108
5	Гептадецен қышқылының цис-10 метил эфирі	1,09
6	Метилгептадеканат	0,148
7	γ-Линолен қышқылы	0,3123
8	Линолен қышқылы	0,074
9	Линол қышқылы	0,776
10	Олеин қышқылы	2,3116
11	Стеарин қышқылы	2,4958
12	Метил-цис-5,8,11,14-эйкозатетраеноидты	0,02173
13	Эйкозатриен қышқылының цис-11,14,17 метил эфирі	0,1014
14	Арахидон қышқылы	0,7296
15	Цервон қышқылы	0,3079
16	Беген қышқылы	0,2867

5-кесте қорытындысы бойынша, май қышқылдарының құрамындағы капрон қышқылының массалық үлесі жоғары болды. 5-сурет май

қышқылдарының хроматограммасы көрсетілген.

Сонымен қатар, консервіленген өттің жалпы микробиологиялық көрсеткіштері анықталды (6 кесте).

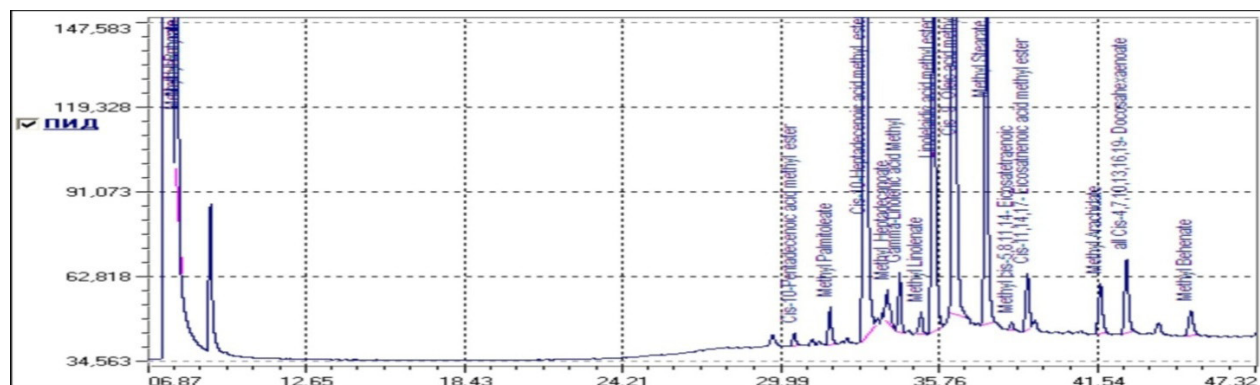
Зерттеу нәтижелері бойынша (6- кесте) микробиологиялық көрсеткіштерге сәйкес сүт қышқылды бактериялар, колиформ тобының бактериялары, ашытқы және мицелиалды саңырауқұлақтар өтінде байқалмағаны анықталды.

Зертханалық жағдайда қоюланған өтті сақтау кезінде ылғалдылық пен белсенді қышқылдығының (рН) оңтайлы параметрлері анықталды (6,7-сурет).

Сақтау кезінде өттің ылғалдылығы 51,22-ден 42,36%-ға дейін төмендеді. 6 – суреттен алынған деректер осындай қорытынды жасауға мүмкіндік берді.

7-суретте көрсетілгендей, өтті сақтау кезінде қоюланған өт үшін белсенді қышқылдық жоғарлап, ол 7,6 құрайтыны анықталды. Бұл көрсеткіш қоюланған өт үшін оңтайлы деп саналып, зертханалық тәжірибелерде дәлелденді.

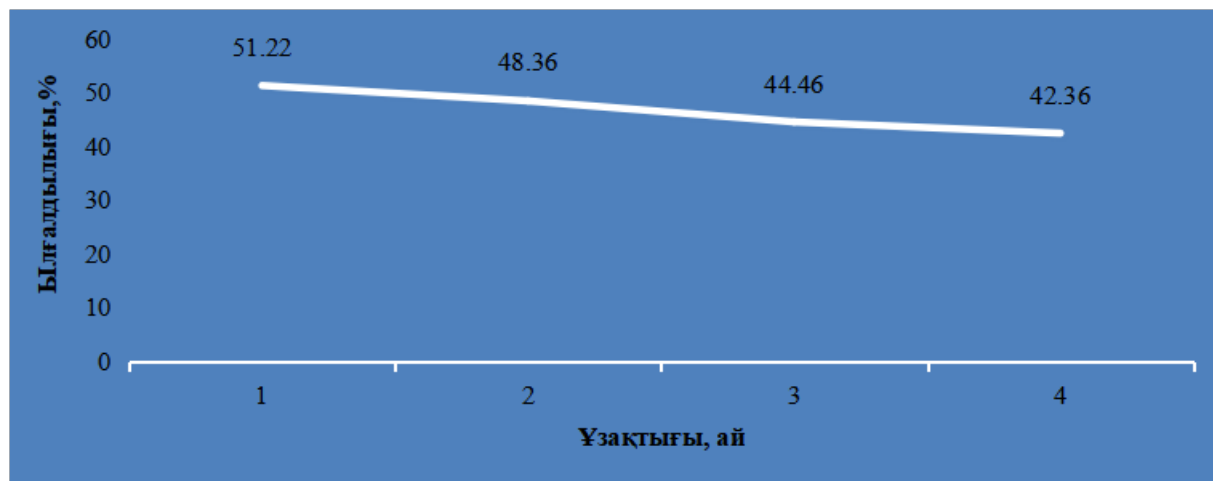
Осы тәжірибелердің нәтижелеріне сүйене отырып, қоюланған өттің технологиялық сызбасы жасалынды: өт қабын кесу → өтті өт қабынан бөліп алу → өтті сүзу (елеуіш) → қайнату 70°C (12-15сағ) → шыны немесе пластик ыдыстарға құю → құрғақ және қараңғы жерде сақтау (12 ай – 2,5жыл). Қоюландыру өттің баяу қайнауымен жүзеге асырылды. Зерттеу нәтижесінде алынған көрсеткіштер ірі қара мал өтін биологиялық белсенді зат ретінде қолдануға болатындығын көрсетті. Дайын болған өнім қою, қара-қоңыр-жасыл реңді, өтке тән ерекше иіспен сипатталды. Қоюландырылған өт табиғи өт салмағының орташа 17% құрады.



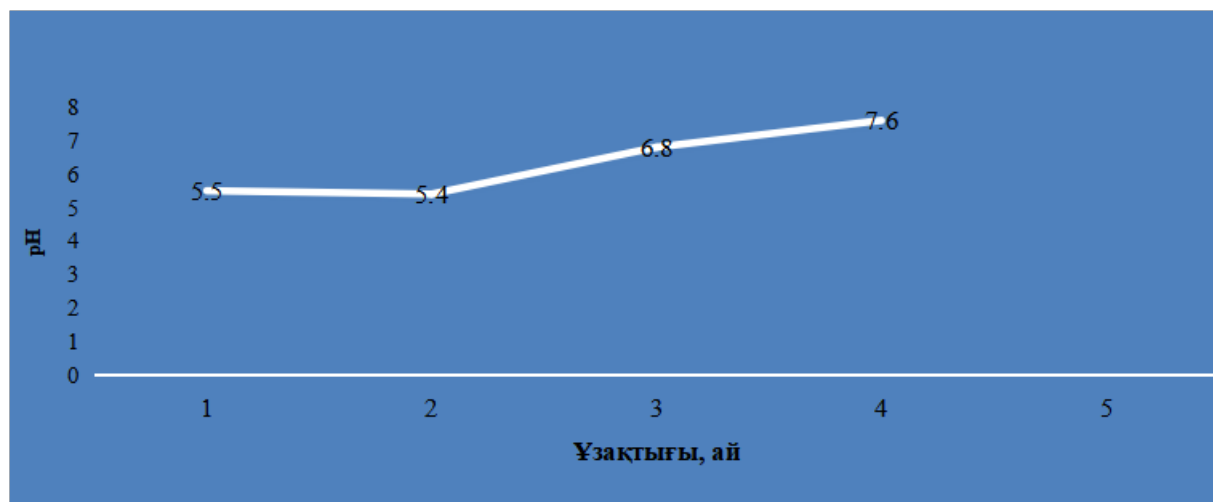
5-сурет – Май қышқылдарының хроматограммасы

6-кесте – Қоюландырылған өттегі ашытқылар мен зең саңырауқұлақтарын және жалпы микрофлораны анықтау

Үлгі№	Мезофильді аэробты және факультативті анаэробты микроорганизмдер санын анықтау әдістері КҚБ бірліктері, г				
	Жалпы саны	Сүт қышқылы мен колиформ бактериялары	Спора түзетін бактериялар	Ашытқы	Мицелиалды саңырауқұлақтар
1	байқалмады	байқалмады	байқалмады	байқалмады	байқалмады



6-сурет – Сақтау кезінде қоюланған өт ылғалдылығының өзгеруі



7-сурет – Сақтау кезінде қоюланған өттің белсенді қышқылдығының өзгеруі

### Қорытынды

Қоюландыру процессінің оптималды көрсеткіші 70°C және қоюлату ұзақтығы 15 сағатты құрады. Технологиялық процесстер жүргізу кезінде, өнімнің химия-биологиялық көрсеткіштері өз қасиетін жоғалтпады. Өттегі құнды

заттар қоюландыру процессінде сақталатыны анықталды. Алынған өнімді 12°C қа салқындатып, ары қарай сақтау мерзімін анықтау үшін сақтауға қойылды. Алынған өнімнің сақтау мерзімі 1 жылды құрады. Зерттеулер нәтижесінде 70°C температураны сақтаған кезде өт тығыздығы жоғары, ал консистенциясы

неғұрлым тығыз болатыны анықталды. Ірі қара малдың өтінің жарамдылық мерзімі мен сақталу шарттары белгіленді. Сақтау кезінде ылғал 51,22-ден 42,36%-ке дейін төмендейді, белсенді қышқылдық жоғарлап, ол 7,6 құрайтыны анықталды. Зерттеу нәтижесінде алынған көрсеткіштер ірі қара мал өтін биологиялық белсенді зат ретінде қолдануға болатындығын көрсетті.

Яғни, жасалған технология өтті алыс жақын елдерге экспорттауға, еліміздің медицина саласына ұсынуға мүмкіншілік тудырады. Өтті экспорттау мақсатында, алынған өнімге өндіріс стандарттарын жасап, технологияны ары қарай жетілдіру көзделіп отыр.

Осыған байланысты, жасалған технология эндокринді-ферменттік және арнайы шикізатты өндеуді дамыту мен терең өндеу, қалдықтардың мөлшерін азайтып қана қоймай, қосымша өнімдер шығару арқылы, мал шаруашылығы кәсіпорындарының тиімділігін арттырады. Мұндай жобалар, тек медицина мен

фармацевтикаға ғана емес, сонымен қатар экономика мен экология мәселесін де шешуге пайдасын тигізери сөзсіз. Өндіріс тиімді ұйымдастырылған жағдайда, арнайы шикізатты пайдалану мен сатудан алынған кіріс өндірістік шығындарды жабуға көмегін тигізеді.

Өкінішке орай, біздің елімізде эндокринді-ферменттік және арнайы шикізатты өндеу жолдары қарастырылмаған. Көп жағдайда сойылған малдың өті лақтырылып тасталады. Осыған орай, мал өнімдерін өндеу өндірістеріне тиімді жобаларды қарастырып, оны іске асыру мәселесін шешу және оны жолға қою жұмыстары жасалуы тиіс.

Сондықтан да, медициналық және ветеринарлық препараттарды өндіруге арналған эндокринді-ферменттік және арнайы шикізаттарды жинау және өндеу – болашағы мен мүмкіндіктері зор бағыттардың бірі болып табылады.

Жасалған зерттеулер, Қазақстан Республикасы Ауылшаруашылық Министрлігінің мақсатты бағдарламалық қаржыландырумен жүргізілді.

#### Әдебиеттер

- 1 Arlia-Ciommo A., Piano A., Svistkova V., Mohtashami S., Titorenko V.I. Mechanisms Underlying the Anti-Aging and Anti-Tumor Effects of Lithocholic Bile Acid // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – P. 16522-16543.
- 2 Boyer J.L. Bile formation and secretion. *Compr. Physiol.* – 2013. – Vol.3. – P. 1035-1078.
- 3 Dodds W.J., Groh W.J., Darweesh R.M., Lawson L., Kishk S.M., Kern M.K. Sonographic measurement of gallbladder volume // *AJR Am. J. Roentgenol.* – 1985. – Vol. 145. – P. 1009-1011.
- 4 Eggert T., Bakonyi D., Hummel W. Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid // *J. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 191. – P. 11-21.
- 5 Everson G.T., Braverman D.Z., Johnson M.L., Kern F.Jr. A critical evaluation of real-time ultrasonography for the study of gallbladder volume and contraction // *Gastroenterology.* – 1980. – Vol.79. – P. 40-46.
- 6 Gill P.T., Dillon E., Leahy A.L., Reeder A., Peel A.L. Ultrasonography, HIDA scintigraphy or both in the diagnosis of acute cholecystitis? // *Br. J. Surg.* – 1985. – Vol.72. – P. 267-268.
- 7 Gubitosi M., Trillo J.V., Vargas A.A., Pavel N.V., Gazzoli D., Sennato S., Jover A., Mejjide F., Galantini L. Characterization of Carbon Nanotube Dispersions in Solutions of Bile Salts and Derivatives Containing Aromatic Substituents // *J. Phys. Chem. B.* – 2014. – Vol. 118. – P. 1012-1021.
- 8 Hofmann A.F., Hagey L.R. Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications // *J. Lipid Res.* – 2014. – Vol. 55. – P. 1553-1595.
- 9 Kong W., Wang J., Xing X., Xiao X., Zhao Y., Zang Q., Zhang P., Jin C., Li Z., Liu W. Antifungal evaluation of cholic acid and its derivatives on *Candida albicans* by microcalorimetry and chemometrics // *Anal. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 689. – P. 250-256.
- 10 Lin, Kohli R., Bile acid metabolism and signaling: potential therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease, *Clin. Transl. Gastroenterol.* – 2018. – Vol.9 – 164 p., <https://doi.org/10.1038/s41424-018-0034-3>.
- 11 Pat. WO 2011/075701 A2 / Methods for the purification of deoxycholic acid / Moriarty R.M., Prasad A.R., Reid J.G., Swearingen Jr. R.A., KYTHERA BIOPHARMACEUTICALS, INC. – 23.06.2011.
- 12 Qiao Y., Lin Y., Zhang S., Huang J. Lanthanide-Containing Photoluminescent Materials. From Hybrid Hydrogel to Inorganic Nanotubes // *Chem. – Eur. J.* – 2011. – Vol. 17. – P. 5180-5187.
- 13 Rodkiewicz C.M., Otto W.J., Scott G.W. Empirical relationships for the flow of bile // *J. Biomech.* – 1979. – Vol.12. – P. 411-413.
- 14 Salvador J.A.R., Carvalho J.F.S., Neves M.A.C., Silvestre S.M., Leitão A.J., Silva M.C., Sá e Melo M.L. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds // *Nat. Prod. Rep.* – 2013. – Vol. 30. – P. 324-374.
- 15 Serfaty L., Poupon R., Therapeutic approaches for hepatobiliary disorders with ursodeoxycholic acid and bile-acid derivatives, *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol* – 2012. – Vol. 36, [https://doi.org/10.1016/S2210-7401\(12\) 70014-1](https://doi.org/10.1016/S2210-7401(12) 70014-1).

- 16 Sharma R., Long A., Gilmer J.F. *Advances in Bile acid Medicinal Chemistry // Curr. Med. Chem.* – 2011. Vol. 18. – P. 4029-4052.
- 17 Blanchet M., Brunel J.M. *Bile Acid Derivatives: From Old Molecules to a New Potent Therapeutic Use: An Overview // Curr. Med. Chem.* – 2018. –Vol. 25(30). – P. 3613-3636.
- 18 Лисицын А.Б., Захаров А.Н., Небурчилова Н.Ф., Волынская И.П., Петрунина И.В., Чернова А.С. Комплексное и рациональное использование побочного сырья на предприятиях мясной отрасли АПК. – М.: ООО «АдванседСолюшнз», 2015.– 80 с.
- 19 Лисицын А.Б., Небурчилова Н.Ф., Горбунова Н.А. Перспективные направления повышения эффективности переработки побочного сырья мясной промышленности// «Инновации в интенсификации производства и переработки сельскохозяйственной продукции» – Материалы Международной научно-практической конференции 17-18 июня 2015 г., Волгоград. – 2015. – С. 209-212.
- 20 Лисицын А.Б., Небурчилова Н.Ф., Петрунина И.В., Чернова А.С. Использование субпродуктов в медицинских целях // Все о мясе. –2015.– №2– С.6-9.
- 21 Лисицын А.Б., Небурчилова Н.Ф., Волынская И.П. История и перспективы переработки эндокринно-ферментного и специального сырья // Мясная индустрия. – 2015. – № 3.–С. 25-27.
- 22 Лисицын А.Б., Небурчилова Н.Ф., Волынская И.П. История и перспективы переработки эндокринно-ферментного и специального сырья // Мясная индустрия. – 2015. – №4. – С. 25-27.
- 23 Машковский М.Д. Лекарственные средства.–М.: Медицина, 1993.– Т.1– С. 604-605.
- 24 Тольсбаев Б.С., Сейсенбинова А.А. Қазақстан республикасындағы тамақ өнеркәсібі кәсіпорындарының инновациялық дамуы: проблемалары мен перспективалары// Экономика: стратегия и практика. –2019. –№ 1 (14) – Б.109-122.
- 25 Чоманов У.Ч., Кененбай Г.С., Мамбешова А.Т., Омиржанова Б.Б. Исследование свойства желчи из желчного пузыря // Наука, производство, бизнес: матер. междунар. научн.-практ. конфер., 4-5 апреля. –Алматы, 2019.–Т. 4.–Б.95-98.

#### References

- 1 Arlia-Ciommo A., Piano A., Svistkova V., Mohtashami S., Titorenko V.I. (2014) Mechanisms Underlying the Anti-Aging and Anti-Tumor Effects of Lithocholic Bile Acid. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, pp. 16522-16543
- 2 Boyer J.L.(2013) Bile formation and secretion. *Compr. Physiol.*, vol.3, pp. 1035–1078.
- 3 Dodds W.J., Groh W.J., Darweesh R.M., Lawson L., Kishk S.M., Kern M.K.(1985) Sonographic measurement of gallbladder volume. *AJR Am. J.Roentgenol.*, vol. 145, pp. 1009-1011.
- 4 Eggert T., Bakonyi D., Hummel W.(2014) Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid. *J. Biotechnol.*, vol.191, pp. 11-21.
- 5 Everson G.T., Braverman D.Z., Johnson M.L., Kern F.Jr.(1980) A critical evaluation of real-time ultrasonography for the study of gallbladder volume and contraction. *Gastroenterology*, vol.79, pp. 40-46.
- 6 Gill P.T., Dillon E., Leahy A.L., Reeder A., Peel A.L.(1985) Ultrasonography, HIDA scintigraphy or both in the diagnosis of acute cholecystitis? *Br. J.Surg.*, vol.72, pp. 267-268.
- 7 Gubitosi M., Trillo J.V., Vargas A.A., Pavel N.V., Gazzoli D., Sennato S., Jover A., Mejjide F., Galantini L. (2014) Characterization of Carbon Nanotube Dispersions in Solutions of Bile Salts and Derivatives Containing Aromatic Substituents. *J. Phys. Chem. B.*, vol. 118, pp. 1012-1021.
- 8 Hofmann A.F., Hagey L.R. (2014) Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications. *J. Lipid Res.*, vol. 55, pp. 1553-1595.
- 9 Kong W., Wang J., Xing X., Xiao X., Zhao Y., Zang Q., Zhang P., Jin C., Li Z., Liu W.(2011) Antifungal evaluation of cholic acid and its derivatives on *Candida albicans* by microcalorimetry and chemometrics. *Anal. Chim. Acta.*, vol. 689, pp. 250-256.
- 10 Lin, Kohli R.(2018) Bile acid metabolism and signaling: potential therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.*, vol.9, pp. 164, <https://doi.org/10.1038/s41424-018-0034-3>.
- 11 Pat. WO 2011/075701 A2. Methods for the purification of deoxycholic acid. Moriarty R.M., Prasad A.R., Reid J.G., Swaringen Jr. R.A., KYTHERA BIOPHARMACEUTICALS, INC. – 23.06.2011.
- 12 Qiao Y., Lin Y., Zhang S., Huang J.(2011) Lanthanide-Containing Photoluminescent Materials. From Hybrid Hydrogel to Inorganic Nanotubes. *Chem. – Eur. J.*, vol. 17, pp. 5180-5187.
- 13 Rodkiewicz C.M., Otto W.J., Scott G.W.(1979) Empirical relationships for the flow of bile. *J.Biomech.*,vol.12, pp. 411-413.
- 14 Salvador J.A.R., Carvalho J.F.S., Neves M.A.C., Silvestre S.M., Leitão A.J., Silva M.C., Sá e Melo M.L.(2013) Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 30, pp. 324-374.
- 15 Serfaty L., Poupon R. (2012) Therapeutic approaches for hepatobiliary disorders with ursodeoxycholic acid and bile-acid derivatives, *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, vol. 36, [https://doi.org/10.1016/S2210-7401\(12\) 70014-1](https://doi.org/10.1016/S2210-7401(12) 70014-1).
- 16 Sharma R., Long A., Gilmer J.F. (2011) *Advances in Bile acid Medicinal Chemistry. Curr. Med. Chem.*, vol. 18, pp. 4029-4052.
- 17 Blanchet M., Brunel J.M. *Bile Acid Derivatives: From Old Molecules to a New Potent Therapeutic Use: An Overview // Curr. Med. Chem.* – 2018. –Vol. 25(30). – P. 3613-3636.
- 18 Лисицын А.Б., Захаров А.Н., Небурчилова Н.Ф., Волынская И.П., Петрунина И.В., Чернова А.С. (2015) Комплексное и рациональное использование побочного сырья на предприятиях мясной отрасли. М.: ООО «Адвансед Солюшнз», pp. 80.



- 19 Lisisyn A.B., Neburchilova N.F., Gorbunova N.A.(2015) Perspektivnye napravlenija povyshenija jeffektivnosti pererabotki pobochnogo syr'ja mjasnoj promyshlennosti . «Inovacii v intensivkacii proizvodstva i pererabotki sel'skohozjajstvennoj produkcii». Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii 17-18 ijunja 2015 g., Volgograd, pp. 209-212.
- 20 Lisisyn A.B., Neburchilova N.F., Petrunina I.V., Chernova A.S. (2015). Ispol'zovanie subproduktov v medicinskih celjah. Vse o mjase. vol. 2, pp. 6-9.
- 21 Lisicyn A.B., Neburchilova N.F., Volynskaja I.P.(2015) Istorija i perspektivy pererabotki jendokrinno-fermentnogo i special'nogo syr'ja. Mjasnaja industrija. vol. 3, pp. 25-27.
- 22 Lisicyn A.B., Neburchilova N.F., Volynskaja I.P. (2015) Istorija i perspektivy pererabotki jendokrinno-fermentnogo i special'nogo syr'ja. Mjasnaja industrija. vol.4, pp. 25-27.
- 23 Mashkovskij M.D.(1993). Lekarstvennye sredstva. M.: Medicina.no.1, pp. 604-605.
- 24 Tolysbaev B.S., Seisenbinova A.A.(2019) Qazaqstan respublikasyndaǵy tamaq ónerkásibi kásiporyndarynyń inovasiyalıq damuy: problemalary men perspektivalary. Ekonomika: strategia i praktika.vol. 1 (14), pp. 109-122.
- 25 Chomanov U.Ch., Kenenbaj G.S., Mambeshova A.T., Omirzhanova B.B. (2019) Issledovanie svojstva zhelchi iz zhelchnogo puzyrja. Nauka, proizvodstvo, biznes: mater.mezhdunar.nauchn.-konfer., 4-5 aprelja. Almaty, no. 4,pp.95-98.

## МАЗМҰНЫ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

### 1-бөлім Ботаника

### Section 1 Botany

### Раздел 1 Ботаника

*Ivashchenko A.A., Kaparbay R.E., Arynov B.B., Mukhitdinov N.M., Sramko G., Abidkulova K.T.*  
Places of growth and biological characteristics of *Hepatica falconeri* (Thoms.) steward at the northern border of its distribution area .....

*Sadyrova G.A., Bazarbaeva T.A., Mukanova G.A., Bayzhigitov D.K., Jamilova S.M.*  
Some features of the history of flora formation in the chu river valley .....

### 2-бөлім Биотехнология

### Section 2 Biotechnology

### Раздел 2 Биотехнология

*Aipova R., Tazabekova E.T., Kurmanbayev A.A.*  
Research of the properties of phosphatmobilizing bacteria perspective for increasing the productivity of agricultural grains....

*Ақишев Ж.Д., Турсунбекова А.Е., Хасенов Б.Б.*  
Молокосвертывающая активность рекомбинантного верблюжьего химозина .....

*Доолоткелдиева Т., Жолдошбекова С., Исмаилова Э.*  
Биотестирование энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* против белокрылки (*Trialeurodes vaporariorum*): лабораторные и полевые эксперименты .....

*Myrzabekova M., Labeit S.B., Nyiazova R.Ye.*  
In silico identification of *Equus caballus* miRNAs with the potential to affect Human gene expression .....

*Жугунисов К.Д., Керимбаев А.А., Конеев С.К., Мырзахметова Б.Ш., Туысканова М.С., Наханов А.К., Хайруллин Б.М., Орынбаев М.Б., Абдураимов Е.О., Касенов М.М., Закарья К., Кутумбетов Л.Б.*  
Вирус SARS-CoV-2: выделение, культивирование, термостабильность, инактивация и пассирование .....

*Хастаева А.Ж., Бектурганова А.А., Омаралиева А.М.*  
Использование гречихи как сырья для производства растительного молока .....

### 3-бөлім Микробиология

### Section 3 Microbiology

### Раздел 3 Микробиология

*Алексюк П.Г., Богоявленский А.П., Алексюк М.С., Аканова К.С., Молдаханов Е.С., Омиртаева Э.С., Березин В.Э.*  
Выделение и характеристика бактериофагов лизирующих клинические штаммы *E. coli* .....

*Кухар Е.В., Киян В.С.*  
Биологические свойства анаморфы и телеоморфы возбудителя интердигитальной трихофитии человека .....

*Kaiyrmanova G.K., Tapeshova Sh.Zh., Shaimerdenova U.T., Magmiyayev R.B., Yernazarova A.K.*  
Identification of microorganisms isolated from oil reservoir water of the akingen field, Kazakhstan .....

### 4-бөлім Зоология

### Section 4 Zoology

### Раздел 4 Зоология

*Кегенова Г.Б., Мусагали Ә.Қ., Шарахметов С.Е.*  
Морфологическая изменчивость амурского чебачка *pseudorasbora parva* (Temminck et Schlegel, 1846) в водоемах Балкашского бассейна .....

*Мека-Меченко В.Г., Сутягин В.В.*  
Результаты мониторинга серого сурка на ограниченном участке Заилийского алатау – зоне активного туризма окрестностей Алматы .....

*Чоманов У.Ч., Кененбай Г.С., Омержанова Б.Б., Татиева А.Н.*  
Ірі қара мал өтінің химия-биологиялық қасиеттері .....