

## 06.02.00 ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

06.02.02 – ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ, ЭПИЗООТОЛОГИЯ, МИКОЛОГИЯ С МИКОТОКСИКОЛОГИЕЙ И ИММУНОЛОГИЯ (БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ)

УДК 578.81

DOI 10.18286/1816-4501-2020-2-130-137

### КОНСТРУИРОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГОВОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ БИОКОНТРОЛЯ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

**Васильев Дмитрий Аркадьевич**, доктор биологических наук, профессор «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Беккалиева Айдын Канатовна**, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Феокистова Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Сулдына Екатерина Владимировна**, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел. 8(8422) 49-55-63;

Email: dav\_ul@mail.ru

**Ключевые слова:** *Pseudomonas syringae*, бактериофаги, литическая активность, специфичность, устойчивость

Фитопатогенные бактерии *Pseudomonas syringae* являются причиной заболевания многих культурных растений, вызывая опухолевые новообразования, гниение, хлороз, некроз и т.д. Наиболее перспективным биологическим средством борьбы с бактериозами в растениеводстве являются бактериофаги. В данной работе представлена полная биологическая характеристика 8 бактериофагов, активных в отношении *Pseudomonas syringae*. Изучаемые фаги формировали схожие негативные колонии - прозрачные, округлые, диаметром 5-9 мм. Литическая активность фагов *Pseudomonas syringae* по Апфельману от  $10^4$  до  $10^8$ ; по Грациа от  $1,0 \pm 0,1 \times 10^6$  до  $2,0 \pm 0,1 \times 10^9$  (БОЕ/мл). Бактериофаги Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-13 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ не изменяли литическую активность при хранении в условиях холодильника в течение 12 месяцев. Литическая активность фагов Ps.s-1 УлГАУ, Ps.s-8, Ps.s-15 УлГАУ, Ps.s-30 УлГАУ, Ps.s-77 УлГАУ в тех же условиях снижалась в пределах 1-2 порядков. Спектр литической активности фагов варьировал от 21,4% (Ps.s-13 УлГАУ) до 85,7% (Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-27 УлГАУ). Изучение специфичности фагов на 15 видах гетерологичных культур, показало, что фаги видоспецифичны для *Pseudomonas syringae*. Фаги умеренно устойчивы к нагреванию и теряют активность при 30-минутном воздействии температуры выше 62°C. Оптимальным способом освобождения фаголизатов от жизнеспособных клеток *Pseudomonas syringae* стал трихлорметан в соотношении 10:1 и временной экспозицией 45 минут. На основании полученных данных определен потенциал каждого бактериофага для использования в качестве агента биоконтроля. Для дальнейших исследований по изучению молекулярно-генетических характеристик отобраны наиболее перспективные штаммы фагов *Pseudomonas syringae* - Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ.

**Исследования проводятся в соответствии с Тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию Минсельхоза России в 2020 году.**

#### Введение

*Pseudomonas syringae* - это видовой комплекс фитопатогенов, поражающий более 180

видов растений. *Pseudomonas syringae* являются причиной заболеваний многих важных для человека культурных растений, что ведет

к значительному экономическому ущербу [1]. Среди болезней, которые они вызывают, различают опухолевые новообразования, гниение, прекращение роста и гибель части растения без загнивания, хлороз, некроз [2, 3, 4, 5].

Заболевания растений, вызываемые *Pseudomonas syringae*, трудно контролировать из-за высокой частоты мутаций, горизонтального переноса генов и видоспецифической изменчивости [2, 6, 7]. Никаких специфических антимикробных средств в настоящее время не разработано. Бесконтрольное воздействие химических веществ, применяемых для дезинфекции в растениеводстве, может привести к развитию устойчивости у данных бактерий [8, 9, 10].

В настоящее время перспективным направлением для контроля бактериальных заболеваний растений являются бактериофаги. Бактериофаги (фаги) - это вирусы, которые заражают бактерии, используя их метаболизм для завершения своей репликации, что приводит к лизису их бактериального хозяина, не причиняя прямого вреда растениям или животным. Фаги являются одним из наиболее распространенных типов организмов в биосфере и почти всегда очень специфичны для своего целевого бактериального хозяина. В настоящее время потенциал использования бактериофагов для биологического контроля *Pseudomonas syringae* активно изучается рядом исследовательских групп [11, 12, 13]. Литическая природа фага, высокая степень специфичности к хозяину, способность сохраняться и размножаться в окружающей среде делают бактериофаги потенциальными кандидатами для борьбы с фитопатогенами [14, 15, 16].

Бактериофаги, используемые в качестве агентов биологического контроля, должны обладать рядом характеристик: высокая литическая активность, специфичность, широкий диапазон хозяев [17, 18, 19, 20].

В связи с этим цель данной работы – дать полную биологическую характеристику бактериофагам, активным в отношении *Pseudomonas syringae*, чтобы понять их потенциал для практического использования в качестве агентов биоконтроля.

#### **Материалы и методы исследований**

Объектами исследования стали 8 бактериофагов, активных в отношении *Pseudomonas syringae*, выделенные из объектов окружающей среды: почвы, воды (река, сточные воды) и сельскохозяйственных растений (листья, плоды, стебли).

В работе было использовано 2 референс-штамма бактерий *B-10917*, полученных из БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИ-генетика, и штамм *Ps.s №3*, полученный из коллекции музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ, а также 13 штаммов, выделенных из объектов внешней среды (почва, вода) и растительного материала (листья и плоды овощей).

Для изучения специфичности бактериофагов были использованы штаммы бактерии: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Saimonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*.

**Питательные среды и реактивы:** набор реагентов для окраски микроорганизмов по методу Грама (НИЦФ Россия, Санкт-Петербург); ГРМ-агар (ФБУН ГНЦПМиБ Россия г Оболенск); ГРМ-бульон (ФБУН ГНЦПМиБ Россия г Оболенск); Среда Кинга В (НИЦФ Россия, Санкт-Петербург); Железосодержащий пептонный агар (HiMedia Laboratories Pvt. Limited Индия); Трихлорметан стабилизированный 0,6-1 % этанола (хлороформ) ч.д.а. ТУ 2631-066-44493179-01.

**Приборы и оборудование:** термостат (ТСО-1/80) ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»; термометр; ультрафиолетовая лампа марки «Phillips» с длиной волны 253 нм; лабораторная стерильная посуда; лабораторные весы (CE323-C); автоклав (ГК-100-3); Дистиллятор (Liston); лабораторные центрифуги (ELMI-Multi centrifuge CM 6M) – 3000 об/м; водяная баня (UT4302E); термометр ртутный; лупа бинокулярная МБС-9; автоклав (ВК-75); шкаф сушильно-стерилизованный (ШШС-80); дистиллятор (ДЭ-50).

Изучение биологических свойств фагов проводили по методам В.Я. Ганюшкина (1988), И.П. Ревенко (1978), Э.Каттер (2012), Д.А.Васильева (2017). Литическую активность определяли по методам Грация и Аппельмана.

Исследования с использованием бактериальных штаммов проводили согласно ГОСТ Р 26670-91. (Методы культивирования микроорганизмов) ГОСТ 17.4.4.02-84, ГОСТ 12430-66.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета программ Statistica Desktop 13 Russian (for Windows; StatSoft Russia (TIBCO USA), Microsoft Excel 2010.

#### **Результаты исследований**

Морфологию негативных колоний изуча-

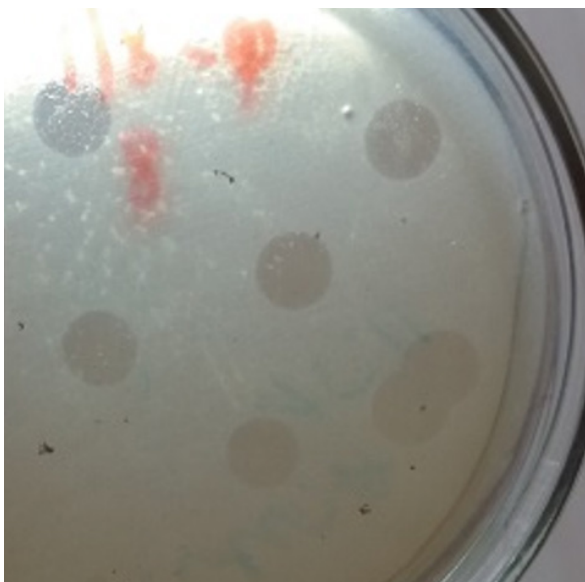


Рис. 1 – Морфология негативных колоний бактериофага *Pseudomonas syringae* Ps.s-8 УлГАУ

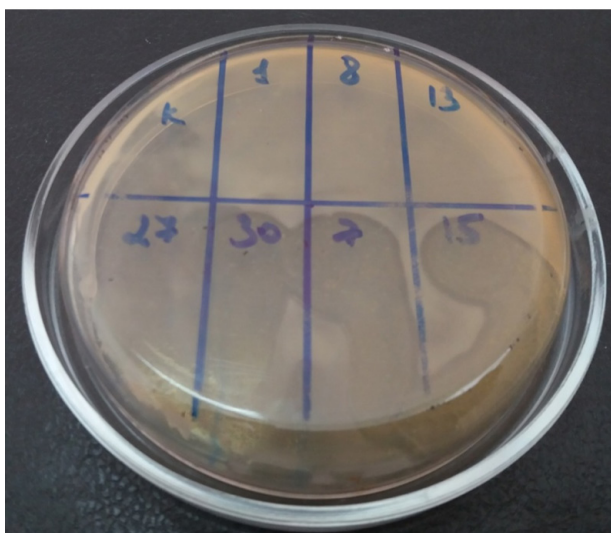


Рис. 2 – Стерильные зоны лизиса в месте нанесения бактериофагов - положительный результат

ли на плотных питательных средах по методу Грациа. Установлено, что бактериофаги бактерий *Pseudomonas syringae* на МПА формировали схожие между собой негативные колонии - прозрачные, округлой формы, без зоны вторичного роста диаметром от 5 до 9 мм.

Литическая активность - это свойство фага вызвать лизис бактериальной культуры на плотной (по методу Грациа) или жидкой (по методу Аппельмана) питательной среде. Для получения достоверных результатов такая активность фага всегда определяется в конкретных, стандартных условиях. В связи с этим индикаторный штамм *Pseudomonas syringae* - Ps.s №3 выращивали на стандартном мясопептонном бульоне в течение 18-20 часов и использовали в эксперименте.

Установлено, что бактериофаги проявляли разную литическую активность на культуре бактериальных клеток штамма №3 *Pseudomonas syringae*. Результаты представлены в таблице 1.

Литическая активность изучаемых бактериофагов *Pseudomonas syringae* составила по Аппельману от  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$ ; по Грациа от  $1,0 \pm 0,1 \times 10^6$  до  $2,0 \pm 0,1 \times 10^9$  (БОЕ/мл).

За изменениями литической активности во время хранения наблюдали в течение года, проверяя результаты через каждые 3 месяца. Все фаги хранились в виде фаголизата бульонной культуры в закупоренных стеклянных флаконах в условиях холодильника при температуре 2 - 4 °С. Результаты определения литической активности по методам Аппельмана и Грациа приведены в таблице 2. Установлено, что бактериофаги Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-13 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ не изменяют свою литическую активность в течение 12 месяцев. Литическая активность фагов Ps.s-1 УлГАУ, Ps.s-8, Ps.s-15 УлГАУ, Ps.s-30 УлГАУ, Ps.s-77 УлГАУ снижалась при хранении в течение года в пределах 1-2 порядков и легко восстанавливалась после 3-5 последовательных пассажей.

Спектр литической активности бактериофагов, т.е. диапазон лизиса гомологичных к бактериофагу бактерий является их характерной особенностью и одним из критериев отбора для включения бактериофага в состав биопрепарата. Диапазон литической активности устанавливали на 15 штаммах *Pseudomonas syringae*, 2 из которых референс-штаммы и 13 - полевые.

На подсушенный газон бактериальной культуры наносили каплю бактериофага по секторам и инкубировали при температуре 28°C в условиях термостата. Оценку результатов проводили через 16-20 часов (рис. 2).

Таблица 1

Литическая активность бактериофага

№	Наименования фага	Литическая активность	
		по Аппельману	по Грациа
1	Ps.s-1 УлГАУ	$10^{-8}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^9$
2	Ps.s-7 УлГАУ	$10^{-8}$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^9$
3	Ps.s-8 УлГАУ	$10^{-6}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^8$
4	Ps.s-13 УлГАУ	$10^{-5}$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^8$
5	Ps.s-15 УлГАУ	$10^{-5}$	$5,0 \pm 0,1 \times 10^7$
6	Ps.s-27 УлГАУ	$10^{-8}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^9$
7	Ps.s-30 УлГАУ	$10^{-7}$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^8$
8	Ps.s-77 УлГАУ	$10^{-4}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^6$

Таблица 2

## Литическая активность бактериофага через 3 месяца хранения

№	Наименования фага	Литическая активность через 3 месяца хранения		Литическая активность через 6 месяца хранения		Литическая активность через 9 месяца хранения		Литическая активность через 12 месяца хранения	
		по Аппельману	по Грациа	по Аппельману	по Грациа	по Аппельману	по Грациа	по Аппельману	по Грациа
1	Ps.s-1	10 <sup>-8</sup>	1,0±0,1×10 <sup>9</sup>	10 <sup>-7</sup>	2,0±0,1×10 <sup>8</sup>	10 <sup>-7</sup>	2,0±0,1×10 <sup>8</sup>	10 <sup>-6</sup>	1,0±0,1×10 <sup>7</sup>
2	Ps.s-7	10 <sup>-7</sup>	2,0±0,1×10 <sup>9</sup>	10 <sup>-8</sup>	2,0±0,1×10 <sup>9</sup>	10 <sup>-8</sup>	2,0±0,1×10 <sup>9</sup>	10 <sup>-8</sup>	1,0±0,1×10 <sup>9</sup>
3	Ps.s-8	10 <sup>-6</sup>	1,0±0,1×10 <sup>8</sup>	10 <sup>-4</sup>	2,0±0,1×10 <sup>6</sup>	10 <sup>-4</sup>	2,0±0,1×10 <sup>6</sup>	10 <sup>-4</sup>	1,0±0,1×10 <sup>6</sup>
4	Ps.s-13	10 <sup>-5</sup>	2,0±0,1×10 <sup>8</sup>	10 <sup>-5</sup>	2,0±0,1×10 <sup>8</sup>	10 <sup>-5</sup>	2,0±0,1×10 <sup>8</sup>	10 <sup>-5</sup>	2,0±0,1×10 <sup>8</sup>
5	Ps.s-15	10 <sup>-5</sup>	5,0±0,1×10 <sup>7</sup>	10 <sup>-5</sup>	3,0±0,1×10 <sup>6</sup>	10 <sup>-5</sup>	3,0±0,1×10 <sup>6</sup>	10 <sup>-4</sup>	2,0±0,1×10 <sup>5</sup>
6	Ps.s-27	10 <sup>-8</sup>	2,0±0,1×10 <sup>9</sup>	10 <sup>-8</sup>	1,0±0,1×10 <sup>9</sup>	10 <sup>-8</sup>	1,0±0,1×10 <sup>9</sup>	10 <sup>-8</sup>	1,0±0,1×10 <sup>9</sup>
7	Ps.s-30	10 <sup>-7</sup>	1,0±0,1×10 <sup>8</sup>	10 <sup>-6</sup>	3,0±0,1×10 <sup>7</sup>	10 <sup>-6</sup>	3,0±0,1×10 <sup>7</sup>	10 <sup>-5</sup>	4,0±0,1×10 <sup>6</sup>
8	Ps.s-77	10 <sup>-4</sup>	1,0±0,1×10 <sup>6</sup>	10 <sup>-4</sup>	2,0±0,1×10 <sup>5</sup>	10 <sup>-4</sup>	2,0±0,1×10 <sup>5</sup>	10 <sup>-3</sup>	3,0±0,1×10 <sup>4</sup>

Таблица 3

Спектр литической активности фагов по отношению к штаммам *Pseudomonas syringae*

№	Наименования фага	Спектр действия %	Наименование штамма бактерии <i>Pseudomonas syringae</i>
1	Ps.s-1 УлГАУ	42,9	B-10917, №3, №5б, №7, №23, №33
2	Ps.s-7 УлГАУ	85,7	B-10917, №3, №3б, №5б, №6б, №11, №7, №23, №4, №33, №37, №38
3	Ps.s-8 УлГАУ	64,3	№7, №1, №5б, №11, №7, №23, №4, №33, №35
4	Ps.s-13 УлГАУ	21,4	B-10917, №3, №33
5	Ps.s-15 УлГАУ	50,0	B-10917, №3, №3б, №6б, №7, №23, №33
6	Ps.s-27 УлГАУ	85,7	B-10917, №3, №3б, №4, №5б, №11, №7, №23, №33, №37, №38, №77
7	Ps.s-30 УлГАУ	50,0	B-10917, №3, №3б, №5б, №7, №23, №33
8	Ps.s-77 УлГАУ	50,0	B-10917, №3, №3б, №6б, №7, №23, №33

Опыты показали, что фаги характеризуются различным спектром литической активности по отношению к бактериальным культурам.

Установлено, что спектр литической активности изучаемых фагов варьировал от 21,4 % (Ps.s-13 УлГАУ) до 85,7 % (Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-27 УлГАУ).

Изучение специфичности действия бактериофагов *Pseudomonas syringae* проводили по методу Отто. Установлено, что все 8 изучаемых бактериофагов специфичны к бактериям вида *Pseudomonas syringae* и не проявляют активности по отношению к представителям других родов и видов бактерий: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Saimonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* (табл. 4).

Таблица 8

Результаты изучения специфичности действия бактериофагов *Pseudomonas syringae*

№	Виды бактерии	Наименование бактериофага							
		Ps.s-1 УлГАУ	Ps.s-7 УлГАУ	Ps.s-8 УлГАУ	Ps.s-13 УлГАУ	Ps.s-15 УлГАУ	Ps.s-27 УлГАУ	Ps.s-30 УлГАУ	Ps.s-77 УлГАУ
1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>Xantomonas campestris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>Saimonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>Echerichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>Pseudomonas syringae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+



Таблица 5

Определение температурной устойчивости бактериофагов *Pseudomonas syringae*

Фаг	Показатель температуры, °C											
	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62
Ps.s-1 УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ps.s-7 УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ps.s-8 УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ps.s-13 УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ps.s-15 УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ps.s-27 УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Ps.s-30 УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ps.s-77 УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Таблица 6

Определение устойчивости фагов *Pseudomonas syringae* к воздействию хлороформа

Временной интервал воздействия трихлорметана объект, минут	Ps.s-1 УлГАУ	Ps.s-7 УлГАУ	Ps.s-8 УлГАУ	Ps.s-13 УлГАУ	Ps.s-15 УлГАУ	Ps.s-27 УлГАУ	Ps.s-30 УлГАУ	Ps.s-77 УлГАУ	Индикаторная культура <i>Pseudomonas syringae</i> Ps.s №3
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	+	+	+	+	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	-
30	+	+	+	+	+	+	+	+	-
35	+	+	+	+	+	+	+	+	-
40	+	+	+	+	+	+	+	+	-
45	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Степень устойчивости бактериофагов и клеточных хозяев к инактивирующим факторам физического воздействия имеет теоретическое и практическое значение, поэтому при изучении биологических свойств фагов определение их чувствительности к таким агентам является обязательным. Нами были проведены исследования по изучению термоустойчивости бактериофагов в диапазоне 40-64 °C в течение 30 минут.

Бактериофаги прогревали на водяной бане при температуре от 40°C до 62 °C с интервалом 2°C в течение 30 минут. Контролем служил стерильный мясопептонный бульон. Качественное изучение активности фагов подвергнутых прогреванию проводили по методу Отто. Культивировали посеы в условиях термостата в течение 18 часов при температуре 28±2 °C. Наличие зоны лизиса в виде «дорожки» свидетельствовало об устойчивости фагов к воздействию температуры (табл. 5).

Установлено, что бактериофаги бактерий *Pseudomonas syringae* умеренно термоустойчи-

вы. Нагрев выше 62 °C приводит к инактивации бактериофагов.

Изучение устойчивости фагов к воздействию хлороформа проводили при следующих условиях: соотношение фаголизата и хлороформа 10:1, время воздействия 5-40 минут с 5-минутным интервалом. Надосадочную жидкость после отстаивания использовали в исследованиях с индикаторным штаммом *Pseudomonas syringae* по методу Отто. Культивировали посеы в условиях термостата в течение 18 часов при температуре 28°C. Наличие зоны лизиса в виде «дорожки» свидетельствовало об устойчивости фагов к воздействию хлороформа. Результаты исследований представлены в таблице 6.

В экспериментах также определено, что контроль в виде индикаторной культуры *Pseudomonas syringae* Ps.s №3 не выдерживал воздействия хлороформа даже в течение 5 минут. В свою очередь изучаемые фаги *Pseudomonas syringae* показали устойчивость к воздействию хлороформа даже при воздействии в течение 45 минут, таким образом обработку хлороформом можно считать оптимальным способом очистки фаголизатов от бактериальных клеток.

### Обсуждение

Фитопатоген *Pseudomonas syringae* является причиной заболевания многих культурных растений и приводит к крупным экономическим потерям сельхозтоваропроизводителей по всему миру [21, 22].

В этом исследовании мы изучили биологические свойства 8 фагов, которые обладают способностью инфицировать и лизировать эти бактериальные патогены и, следовательно, потенциально могут быть использованы в качестве агентов биологического контроля *Pseudomonas syringae*.

Для того, чтобы фаг был эффективным агентом биологического контроля, предпочтительно, чтобы он обладал способностью лизировать целый ряд генетически разнообразных штаммов бактериального патогена. В связи с этим спектр литической активности фагов устанавливался нами на 15 штаммах *Pseudomonas syringae*, в т.ч выделенных из объектов внешней среды, что позволило определить штаммы фагов с широким диапазоном хозяев - Ps.s-7 УлГАУ,

Ps.s-27 УлГАУ.

Изучение специфичности фагов на 15 видах гетерологичных культур показало, что все 8 изучаемых бактериофагов видоспецифичны для *Pseudomonas syringae* и не оказывают негативного воздействия на другие бактерии.

Все изучаемые фаги имели схожую морфологию негативных колоний и продуцировали прозрачные бляшки, демонстрируя цикл литической инфекции, что ограничивает риск горизонтальной передачи патогенного гена, возможного при лизогенном фаге [23].

Для определения оптимального способа очищения фаголизата от бактериальных клеток была изучена устойчивость фагов *Pseudomonas syringae* к воздействию физических и химических факторов. Исследования показали, что изучаемые фаги умеренно устойчивы к нагреванию и теряют активность при 30-минутном воздействии температуры выше 62°C.

Оптимальным же способом освобождения фаголизатов от жизнеспособных бактериальных клеток *Pseudomonas syringae* стал трихлорметан в соотношении 10:1 и временной экспозицией 45 минут.

Чтобы использовать фаг в качестве агента биологического контроля, он должен быть способен сохраняться в течение продолжительного периода времени, не снижая свою литическую активность. Результаты изучения литической активности фагов при хранении в условиях холодильника показали, что бактериофаги Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-13 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ не снижали литическую активность в процессе хранения, а литическая активность фагов Ps.s-1 УлГАУ, Ps.s-8, Ps.s-15 УлГАУ, Ps.s-30 УлГАУ, Ps.s-77 УлГАУ снижалась при хранении в течение года в пределах 1-2 порядков и легко восстанавливалась после 3-5 последовательных пассажей. Таким образом, хранение фагов в условиях холодильника при температуре 2 - 4 °C является оптимальным. Эти выводы подтверждаются рядом исследователей [24].

Изучаемые фаги потенциально могут быть использованы в качестве биологического контроля *Pseudomonas syringae*.

#### **Заключение**

В работе дана полная биологическая характеристика 8 бактериофагов, активных в отношении *Pseudomonas syringae* по таким биологическим свойствам, как морфология негативных колоний, литическая активность фагов и ее изменение в процессе их хранения, спектр литической активности, специфичность и устойчивость

фагов к воздействию физических и химических факторов. На основании полученных данных определен потенциал каждого бактериофага для использования в качестве агента биоконтроля. Для дальнейших исследований по изучению молекулярно-генетических характеристик отобранные наиболее перспективные штаммы фагов *Pseudomonas syringae* - Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ.

#### **Библиографический список**

1. Xin X. F., Kvitko B., He S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Т. 16. – №. 5. – С. 316.
2. Jones J. B. et al. Bacteriophages for plant disease control //Annu. Rev. Phytopathol. – 2007. – Т. 45. – С. 245-262.
3. Stone A., Baker B. Organic management of late blight of potato and tomato with copper products. – 2017. URL: <https://eorganic.org/node/573>
4. O'Leary B. M. et al. Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* //Plant, cell & environment. – 2016. – Т. 39. – №. 10. – С. 2172-2184.
5. Moyano L. et al. Bacteriophytochromes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulate the early stages of plant colonization during bacterial speck disease //European Journal of Plant Pathology. – 2020. – Т. 156. – №. 3. – С. 695-712.
6. Hadley J., Radford P. The Use of Copper-based Formulations on *Pseudomonas Syringae* Pv. *Actinidiae* //Caribbean Journal of Science. – 2018. – Т. 51. – №. 2. – С. 380-383.
7. Monteil C. L. et al. Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens // Microbial genomics. – 2016. – Т. 2. – №. 10. Doi [10.1099/mgen.0.000089](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000089) URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359406/>
8. Durairaj K. et al. Characterization and assessment of two biocontrol bacteria against *Pseudomonas syringae* wilt in *Solanum lycopersicum* and its genetic responses //Microbiological research. – 2018. – Т. 206. – С. 43-49.
9. Xin X. F., Kvitko B., He S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen //Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Т. 16. – №. 5. – С. 316.
10. Yoo S. J. et al. *Aspergillus terreus* JF27

Promotes the Growth of Tomato Plants and Induces Resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* //Mycobiology. – 2018. – T. 46. – №. 2. – C. 147-153.

11. Yu J. G. et al. Isolation and characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit //J. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – T. 26. – №. 2. – C. 385-393.

12. Rombouts S. et al. Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri* //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 279.

13. Pinheiro L. A. M. et al. Efficiency of Phage  $\phi 6$  for Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: An in Vitro Preliminary Study //Microorganisms. – 2019. – T. 7. – №. 9. – C. 286.

14. Yu J. G. et al. Environmental Microbiology/Microbial Diversity: Isolation and Characterization of Bacteriophages Against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Causing Bacterial Canker Disease in Kiwifruit //Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – T. 26. – №. 2. – C. 385-393.

15. Buttner C. et al. Bacteriophages and bacterial plant diseases //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 34.

16. Quiñones-Aguilar E. E. et al. Bacteriophages in the biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, causal agent of halo blight in bean //Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. – 2018. – T. 5. – №. 14. – C. 191-202.

17. Jagdale S. et al. Green approach to phytopathogen: Characterization of lytic bacteriophages of *Pseudomonas* sp., an etiology of the bacterial

blight of pomegranate //Microbiological research. – 2019. – T. 228. – C. 126300.

18. Yin Y. et al. Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* //Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science. – 2019. – T. 69. – №. 3. – C. 199-208.

19. Rombouts S. Management of the bacterial pathogens *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pseudomonas syringae* pv. *porri* in cabbage and leek production using novel bacteriophages. – 2017.

20. James S. L. et al. Isolation, Characterisation and Experimental Evolution of Phage that Infect the Horse Chestnut Tree Pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* //Current Microbiology. – 2020. – C. 1-10.

21. Spotts R. A. et al. Bacterial canker of sweet cherry in Oregon—infection of horticultural and natural wounds, and resistance of cultivar and rootstock combinations //Plant Disease. – 2010. – T. 94. – №. 3. – C. 345-350.

22. Hulin M. T. et al. Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum //Plant pathology. – 2018. – T. 67. – №. 5. – C. 1177-1193.

23. Penadés J. R. et al. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes //Current opinion in microbiology. – 2015. – T. 23. – C. 171-178.

24. Gašić K. et al. Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage K $\Phi$ 1, its survival and potential in control of pepper bacterial spot //Frontiers in microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 2021.

## BACTERIOPHAGE PREPARATION ENGINEERING FOR BIOCONTROL OF PSEUDOMONAS SYRINGAE IN CROP SCIENCE

Vasiliev D. A., Bekkaliyeva A.K., Feoktistova N. A., Suldina E. V.  
FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk, Novy Venets boulevard, 1; tel. 8(8422) 49-55-63;

Email: dav\_ul@mail.ru

**Key words:** *Pseudomonas syringae*, bacteriophages, lytic activity, specificity, stability

Phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* cause diseases of many cultivated plants, causing tumor neoformation, rot, chlorosis, necrosis, etc. The advanced biological mean to control bacteriosis in crop science is bacteriophages. In this work full biological characteristic of 8 bacteriophages is shown, active according to *Pseudomonas syringae*. The studied phages formed similar negative colonies—clear, rounded, in diameter of 5-9 mm. Lytic activity of phages *Pseudomonas syringae* by Appelman from 10<sup>-4</sup> to 10<sup>-8</sup>; by Gratia from 1,0±0,1×10<sup>6</sup> to 2,0±0,1×10<sup>9</sup> (BFU/ml). Bacteriophages Ps.s-7 UIGAU, Ps.s-13 UIGAU and Ps.s-27 UIGAU did not change lytic activity when storing in fridge during 12 months. Lytic activity of phages Ps.s-1 UIGAU, Ps.s-8, Ps.s-15 UIGAU, Ps.s-30 UIGAU, Ps.s-77 UIGAU in the same conditions fell within 1-2 orders. Spectrum of lytic activity of phages varied from 21,4% (Ps.s-13 UIGAU) to 85,7% (Ps.s-7 UIGAU, Ps.s-27 UIGAU). The study of phage specificity on 15 species of heterologous cultures showed that phages are specific for *Pseudomonas syringae*. Phages are moderately stable to heating and lose activity during 30-minute temperature effect above 62°C. The optimal way to relieve phage lysate from living cells of *Pseudomonas syringae* was trichloromethane at a ratio of 10:1 and temporal exposition 45 minutes. On the basis of obtained data we determined capacity of each bacteriophage for the use as biocontrol agent. For further research for the study of molecular genetic characteristics we selected advanced strains of phages *Pseudomonas syringae* - Ps.s-7 UIGAU u Ps.s-27 UIGAU.

**Bibliography**

1. Xin X. F., Kvitko B., He S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – V. 16. – №. 5. – P. 316.
2. Jones J. B. et al. Bacteriophages for plant disease control //Annu. Rev. Phytopathol. – 2007. – V. 45. – P. 245-262.
3. Stone A., Baker B. Organic management of late blight of potato and tomato with copper products. – 2017. URL: <https://eorganic.org/node/573>
4. O'Leary B. M. et al. Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* //Plant, cell & environment. – 2016. – V. 39. – №. 10. – P. 2172-2184.
5. Moyano L. et al. Bacteriophytochromes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulate the early stages of plant colonization during

- bacterial speck disease // *European Journal of Plant Pathology*. – 2020. – V. 156. – №. 3. – P. 695-712.
6. Hadley J., Radford P. The Use of Copper-based Formulations on *Pseudomonas Syringae* Pv. Actinidiae // *Caribbean Journal of Science*. – 2018. – V. 51. – №. 2. – P. 380-383.
  7. Monteil C. L. et al. Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens // *Microbial genomics*. – 2016. – V. 2. – №. 10. Doi 10.1099/mgen.0.000089 URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359406/>
  8. Durairaj K. et al. Characterization and assessment of two biocontrol bacteria against *Pseudomonas syringae* wilt in *Solanum lycopersicum* and its genetic responses // *Microbiological research*. – 2018. – V. 206. – P. 43-49.
  9. Xin X. F., Kvitko B., He S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – V. 16. – №. 5. – P. 316.
  10. Yoo S. J. et al. *Aspergillus terreus* JF27 Promotes the Growth of Tomato Plants and Induces Resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato // *Mycobiology*. – 2018. – V. 46. – №. 2. – P. 147-153.
  11. Yu J. G. et al. Isolation and characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae causing bacterial canker disease in kiwifruit // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V. 26. – №. 2. – P. 385-393.
  12. Rombouts S. et al. Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. porri // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 279.
  13. Pinheiro L. A. M. et al. Efficiency of Phage  $\phi 6$  for Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: An in Vitro Preliminary Study // *Microorganisms*. – 2019. – V. 7. – №. 9. – P. 286.
  14. Yu J. G. et al. Environmental Microbiology/Microbial Diversity: Isolation and Characterization of Bacteriophages Against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae Causing Bacterial Canker Disease in Kiwifruit // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – V. 26. – №. 2. – P. 385-393.
  15. Buttimer C. et al. Bacteriophages and bacterial plant diseases // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 34.
  16. Quiñones-Aguilar E. E. et al. Bacteriophages in the biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, causal agent of halo blight in bean // *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. – 2018. – V. 5. – №. 14. – P. 191-202.
  17. Jagdale S. et al. Green approach to phytopathogen: Characterization of lytic bacteriophages of *Pseudomonas* sp., an etiology of the bacterial blight of pomegranate // *Microbiological research*. – 2019. – V. 228. – P. 126300.
  18. Yin Y. et al. Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae // *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*. – 2019. – V. 69. – №. 3. – P. 199-208.
  19. Rombouts S. Management of the bacterial pathogens *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pseudomonas syringae* pv. *porri* in cabbage and leek production using novel bacteriophages. – 2017.
  20. James S. L. et al. Isolation, Characterisation and Experimental Evolution of Phage that Infect the Horse Chestnut Tree Pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* // *Current Microbiology*. – 2020. – P. 1-10.
  21. Spotts R. A. et al. Bacterial canker of sweet cherry in Oregon—infection of horticultural and natural wounds, and resistance of cultivar and rootstock combinations // *Plant Disease*. – 2010. – V. 94. – №. 3. – P. 345-350.
  22. Hulin M. T. et al. Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum // *Plant pathology*. – 2018. – V. 67. – №. 5. – P. 1177-1193.
  23. Penadés J. R. et al. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes // *Current opinion in microbiology*. – 2015. – V. 23. – P. 171-178.
  24. Gašić K. et al. Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage KΦ1, its survival and potential in control of pepper bacterial spot // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 2021.