

УДК 632.3.01/.08

**ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
БАКТЕРИОФАГОВ PSEUDOMONAS SYRINGAE**

**А.К. Беккалиева, аспирант,
8(8422) 55-95-47, aidyn_kanatovna@mail.ru**
**Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,
8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru**
**Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,
8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru**
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: бактерии, бактериофаги, биопрепарат, *Pseudomonas syringae*.

*В статье представлены материалы по разработке технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата для диагностики бактерии вида *Pseudomonas syringae*. Были изучены температурные показатели культивирования и количественное соотношение бактериофага и культуры при культивировании выделенных бактериофагов. Установлено что для бактериофага *Pseudomonas syringae* Ps.s-7 УлГАУ и индикаторной культуры Ps.s-27 УлГАУ оптимальным соотношением является 1:1, т.е. 0,2 мл фага:0,2 мл индикаторной культуры, температура культивирования системы бактериофаг-бактерия - 28°C.*

Введение. С середины прошлого столетия бактериофагов стали широко использовать для диагностики различных бактериальных инфекции [1]. На данный момент многие исследователи проявляют все больше интереса и используют на практике бактериофагов позволяющих дифференцировать возбудителей бактериальных видов [2].

Бактериофаги вездесущи и распространены в разных экосистемах. Для бактерий, живущих в или на растениях-хозяевах, фаги также могут оказывать значительное влияние на взаимодействие растительных бактерий. Потенциальные механизмы, формирующие это взаимодействие, включают лизирование бактериальных клеток, горизонтальный перенос генов между бактериальными геномами и изменение бактериального фенотипа [3]. Эволюция устойчивости к паразитам является фундаментально важной для экологии болезней, однако мы по-прежнему не можем предсказать, когда и как будет развиваться резистентность [4]. Это в значительной степени обусловлено контекстно-зависимым характером взаимодействия хозяина с паразитом, поскольку польза от устой-

чивости будет зависеть от абиотической и биотической среды [5]. Таким образом, это зависящее от контекста преимущество устойчивости к фагам привело к различным эволюционным результатам в разных средах. Эти результаты подчеркивают важность изучения эволюции устойчивости к паразитам в экологически значимых средах [6].

Цель исследования: изучить температурные показатели и количественное соотношение в системе фаг-культура выделенных бактериофагов Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-27 УлГАУ и индикаторной культуры *Pseudomonas syringae* № 3.

Материалы и методы. Для исследования мы использовали штамм бактерии *Pseudomonas syringae* № 3, полученный из коллекции музея кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой ((ГРМ-бульон) и мясо-пептонный агар (г. Оболенск Московская область Серпуховской район)), бактериофаги, специфичные для *Pseudomonas syringae*: Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-27 УлГАУ, выделенные и селекционированные авторами; холодильник, водяная баня, термостат.

Изучение биологических свойств фагов проводили по методам, описанным в научных работах [7-10].

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

Результаты исследований и их обсуждение. На первом этапе наших исследования были изучены температурные показатели культивирования выделенного бактериофага. Для этого в опытную пробирку, содержащую стерильный 1,5% МПБ в объеме 4,5 мл (рН 7,4-7,6) вносили 0,2 мл суточной культуры *Pseudomonas syringae* штамм № 3 в две пробирки, в одну добавляли 0,2 мл бактериофага Ps.s-7 УлГАУ и другую – 0,2 мл Ps.s-27 УлГАУ. Параллельно ставился контроль. Для чего, в пробирки, содержащие стерильный 1,5% МПБ в объеме 4,5 мл (рН 7,4-7,6), вносили суточную культуру *Pseudomonas syringae* штамм №3 в количестве 0,2 мл. Пробирки помещали в термостат (культивирование при температуре: 19 °С). Далее опыт проверяли 22°С, 25°С, 28°С, 31°С, 34°С, 37°С, 40°С соответственно.

Помутнение пробирки указывало на отсутствие лизиса, просветление в сравнении с контролем на наличие лизиса.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что оптимальная температура культивирования бактериофагов Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ находится в диапазоне 25°С -31 °С. Нами решено инкубировать систему фаг-культура Ps.s-7 УлГАУ -*Pseudomonas syringae* штамм №3 и

Таблица 1 – Температурные показатели культивирования бактериофага

Название бактериофага	Температура культивирования фага, °С							
	19	22	25	28	31	34	37	40
Ps.s-7 УлГАУ	-	-	+	+	+	-	-	-
Ps.s-27УлГАУ	-	-	+	+	+	-	-	-

Примечание:

«-» - отсутствие лизиса,

«+» - лизис.

Ps.s-27 УлГАУ - *Pseudomonas syringae* штамм №3 при температуре 28⁰С.

На втором этапе исследования мы подбирали количественное соотношение бактериофага и культуры для культивирования. В опытную пробирку, содержащую стерильный 1,5% МПБ в объеме 4,5 мл (рН 7,4-7,6), вносили 0,2 мл фага *Pseudomonas syringae* Ps.s-7 УлГАУ и также в другую пробирку Ps.s-27 УлГАУ, затем в пробирку вносили 24 часовую культуру *Pseudomonas syringae* штамм №3, сначала 0,2 мл, затем 0,4 мл и т.д. постепенно доводя объем культуры до 2,5 мл. Параллельно ставился контроль. Для этого в пробирку, содержащую стерильный 1,5% МПБ в объеме 4,5 мл (рН 7,4-7,6) вносили культуру *Pseudomonas syringae* штамм №3 по 0,2 мл.пробирки помещали в термостат и культивировали при температуре 28⁰С.

Выводы. В результате исследований было установлено, что для бактериофагов *Pseudomonas syringae* Ps.s-7 УлГАУ и Ps.s-27 УлГАУ оптимальным количественным соотношением бактериофага и культуры является соотношение 1:1, т.е. 0,2 мл фага x 0,2 мл индикаторной культуры и температуре 28⁰С.

Исследования проводятся по техническому заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации 2020 года.

Библиографический список:

1. Diard M. Inflammation boosts bacteriophage transfer between *Salmonella spp* M. Diard //Science. – 2017. – Т. 355. – №. 6330. – С. 1211-1215

2. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. – 311 p.
3. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.
4. Comparison of lipid-containing bacterial and archaeal viruses / N.S. Atanasova, A. Senčilo, M.K. Pietilä, E. Roine, H.M. Oksanen, D.H. Bamford // In Advances in virus research. Academic Press. – 2015. - Vol. 92. - P. 1-61.
5. *Pseudomonas* predators: Understanding and exploiting phage–host interactions / J. De Smet, H. Hendrix, B.G. Blasdel, K. Danis-Wlodarczyk, R. Lavigne // Nature Reviews Microbiology. – 2017. – Vol. 15(9)/ - P. 517.
6. Genomic Features and Lytic Activity of the Bacteriophage PPPL-1 Effective against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae, a Cause of Bacterial Canker in Kiwifruit / J. Park, J.A. Lim, J. G. Yu, C.S. Oh // Journal of microbiology and biotechnology. – 2018. – Vol. 28(9). – P. 1542-1546
7. Протейные бактериофаги: изучение некоторых биологических свойств / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017 - № 4(40). – С. 75-80.
8. Изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017 - № 3(39). – С. 99-105.
9. Антология научно-методических материалов по изучению бактериофагов. / Васильев Д.А., Золотухин С.Н. – Ульяновск, УГСХА; 2017. – С. 2011.
10. Основные технологические параметры изготовления биопрепарата для борьбы с возбудителем сосудистого бактериоза крестоцветных / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. - № 1(49). – С. 60-64.

SELECTION OF *PSEUDOMONAS SIRINGAE* BACTERIOPHAGE CULTIVATION PARAMETERS

A.K. Bekkaliyeva, N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev

Keywords: *bacteria, bacteriophages, biopreparation, Pseudomonas syringae.*

The article presents materials on the development of technological parameters for the manufacture and control of biopreparation for the diagnosis of bacteria of the species Pseudomonas syringae. The culturing temperatures and quantitative ratio of bacteriophage to culture in culturing isolated bacteriophages were studied. For the bacteriophage Pseudomonas syringae Ps.s-7 UIGAU and the indicator culture Ps.s-27 UIGAU the optimal ratio is 1:1, i.e. 0.2 ml phage: 0.2 ml indicator culture, the culture temperature of the bacteriophage-bacterium system is 28°C.