

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФАГОВОГО
БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ *PSEUDOMONAS*
SYRINGAE В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ**

Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,
8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Сулдына Е.В., ассистент, 8(8422) 55-95-47,
e.suldina2006@yandex.ru

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор,
8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Еспембетов Б.А., кандидат ветеринарных наук,
заведующий лабораторией микробиологии, 8(726-36) 7-
22-28, ribsp@biosafety.kz

**РГП «Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности» Комитета науки
Министерства образования и науки Республики
Казахстан**

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, фаговый
биопрепарат, индикация, огурцы, бактериологическая схема,
семена.

В статье представлены результаты исследований по изучению эффективности применения фагового биопрепарата, состоящего из 2 бактериофагов Ps.s-27 УлГАУ и Ps.s-7 УлГАУ, для индикации *Pseudomonas syringae* в семенном материале и растительном сырье на примере огурца. Установлено, что реакция нарастания титра фага не уступает по эффективности бактериологическому методу выделения и идентификации вышеназванных бактерий.

Очевидна также экономия расходных материалов и трудозатрат при ее постановке по сравнению с бактериологическим методом. Необходимо также отметить и сокращение времени исследования с 192 часов до 23 часов.

Исследования проводились в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2020 году.

Культура питания в Российской Федерации свидетельствует о том, что потребление томатов, огурцов и цуккини довольно частое, поэтому данные овощи выращивают в стране как в промышленных масштабах, так и на приусадебных участках («EVENTUS Consulting», 2019) [1]. Экономический ущерб от инфекций, вызванных *Pseudomonas syringae*, на данных культурах диктует необходимость разработки методологии ускоренной индикации в объектах внешней среды (вода, почва), семенном материале и товарных овощах (томатах, огурцах, цуккини) [2-3].

Актуально на текущий момент применение фаговых биопрепаратов в АПК для лечения и профилактики бактериозов у животных, птиц и рыб, а также бактериозов растений, которые наносят экономический ущерб, как альтернативы противомикробным синтетическим препаратам [4-5].

Цель работы - изучение эффективности применения фагового биопрепарата, состоящего из 2 бактериофагов Ps.s-27 УлГАУ и Ps.s-7 УлГАУ, для индикации *Pseudomonas syringae* в семенном материале и растительном сырье на примере огурца.

Материалы и методы. Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства нами были проведены исследования проб семенного материала (семена огурцов некоммерческого (домашние) пробы под номерами 1-4, 10-11 и коммерческого происхождения – пробы № 5-9), растительной продукции (огурцы), приобретенной на продовольственных рынках г. Ульяновска и г. Димитровграда на наличие бактерий вида *Pseudomonas syringae* с помощью специфических бактериофагов Ps.s-27 УлГАУ и Ps.s-7 УлГАУ.

Отбор проб для исследований осуществляли в соответствии с требованиями, изложенными в ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов (с Изменением № 1) [6].

Идентификацию бактерий *Pseudomonas syringae* осуществляли бактериологическим методом по авторской схеме и методом постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) [7-8]. Для изучения биохимических свойств выделенных штаммов определяли у них наличие оксидазы, каталазную активность, способность использовать источников углерода (глюкозу, лактозу, сахарозу, маннозу, сорбит), использование аргинингидролазы, способность к гидролизу эскулина, желатина и крахмала, а также продукцию сероводорода. Устойчивость штаммов к абиотическим факторам: рост при среде 5 % концентрации NaCl, действие температурного фактора (рост при +41°C).

Общее время исследований по схеме занимает 192 часа.

Результат постановки РНФ определяли подсчетом бляшкообразующих единиц (БОЕ) бактериофага в опыте и контроле чашках. Положительный результат постановки РНФ – это увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с

контролем в 5 и более раз.

Результаты исследований и обсуждение. Изучение микробной контаминации 11 проб семян огурца с применением бактериологической схемы позволило идентифицировать в двух пробах бактерий *Pseudomonas syringae* (№ 3 и № 11).

РНФ с применением фагового биопрепарата (Ps.s-27 УлГАУ и Ps.s-7 УлГАУ) дала положительный результат в пробах семян огурцов № 3 и № 11, что представлено в таблице 1. То есть был получен аналогичный результат по индикации в пробах семян огурца методом фагоиндикации, время постановки эксперимента 23 часа.

Таблица 1 - Результаты использования РНФ для индикации бактерий вида *Pseudomonas syringae* в пробах семян огурца

№ пробы	Количество БОЕ в контроле (M±m)	Количество БОЕ в опыте (M±m)	Увеличение титра фага, раз	Результат постановки РНФ	Результат применения бактериологической схемы
1	7±2	7±2	-	отрицательно	отрицательно
2	7±2	8±1	-	отрицательно	отрицательно
3	7±2	56±1	8,0	положительно	положительно
4	7±2	9±1	-	отрицательно	отрицательно
5	7±2	7±1	-	отрицательно	отрицательно
6	7±2	12±1	-	отрицательно	отрицательно
7	7±2	8±1	-	отрицательно	отрицательно
8	7±2	10±1	-	отрицательно	отрицательно
9	7±2	7±2	-	отрицательно	отрицательно
10	7±2	12±1	-	отрицательно	отрицательно
11	7±2	63±1	9,0	положительно	положительно

Свободный фаг при исследовании обнаружен не был.

Выделение и идентификация бактерий *Pseudomonas syringae* по бактериологической схеме позволило

идентифицировать наличие вышеназванных микроорганизмов в пробах № 5 и № 7 из 12 (таблица 3).

Таблица 2 - Результаты использования РНФ для индикации бактерий вида *Pseudomonas syringae* в пробах огурцов

№ пробы	Количество БОЕ в контроле (M±m)	Количество БОЕ в опыте (M±m)	Увеличение титра фага, раз	Результат постановки РНФ	Результат применения бактериологической схемы
1	9±1	10±1	-	отрицательно	отрицательно
2	9±1	8±2	-	отрицательно	отрицательно
3	9±1	11±1	-	отрицательно	отрицательно
4	9±1	9±3	-	отрицательно	отрицательно
5	9±1	63±1	7,0	положительно	положительно
6	9±1	8±2	-	отрицательно	отрицательно
7	9±1	56±1	6,2	положительно	положительно
8	9±1	12±2	-	отрицательно	отрицательно
9	9±1	10±1	-	отрицательно	отрицательно
10	9±1	14±2	-	отрицательно	отрицательно
11	9±1	15±2	-	отрицательно	отрицательно
12	9±1	9±2	-	отрицательно	отрицательно

Свободный фаг при исследовании обнаружен не был.

Поставив РНФ с использованием скунструированного авторами фагового биопрепарата, включающего фаги Ps.s-27 УлГАУ и Ps.s-7 УлГАУ мы получили положительные результаты индикации бактерии вида *Pseudomonas syringae* в исследуемых пробах огурцов № 5 и № 7 (таблица 2).

Проведенные нами исследования по идентификации выделенных бактериальных культур бактериологическим методом отражены в таблице 3.

Таблица 3 – Биологические свойства выделенных бактериальных культур из проб объектов санитарного надзора и референс-штаммов *Pseudomonas syringae*

№	Показатель	Объекты исследований и номера проб				Референс-штаммы бактерий	
		семена огурца		B-10917		B-10917	№ 3
		3	11	5	7		
1	Окраска по Граму	-	-	-	-	-	-
2	Подвижность	+	+	+	+	+	+
3	Спорообразование	-	-	-	-	-	-
4	Флуоресценция	+	+	+	+	+	+
5	Тест на оксидазу	-	-	-	-	-	-
6	Тест на каталазу	+	+	+	+	+	+
7	Тест на аргинингидралазу	-	±	±	±	±	±
8	Разжижение желатина	-	-	-	+	-	+
9	Гидролиз крахмала	-	-	-	-	-	-
10	O/F тест	0	0	0	0	0	0
11	Липолитическая (твиназная) активность	+	+	+	+	+	+
12	Лецитиназная активность	-	-	-	-	-	-
13	Образование левана	+	+	+	+	+	+
14	индола	-	-	-	-	-	-
15	сероводорода	-	-	-	-	-	-
16	Ферментация глюкозы	+	+	+	+	+	+
17	лактозы	-	-	-	-	-	-
18	сахарозы	±	+	±	+	±	+
19	маннозы	+	+	+	+	+	+
20	сорбита	-	+	+	+	+	+
21	Рост на МПА при 41°C	-	-	-	-	-	-
22	Рост в МПА с 5% NaCl	-	-	-	-	-	-
23	Тест на мацерацию	-	-	-	-	-	-
24	Гиперчувствительность	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» - положительная реакция,

«-» - отрицательная реакция,

«±» - вариабельный результат.

Из данных таблицы 3 ясно, что у выделенных бактериальных культур- зафиксированы отрицательные результаты по тестам на оксидазу и аргинингидралазу, определена продукция каталазы. По литературным данным

бактерий *Pseudomonas syringae* разжижают желатин variabelно [2, 9], в наших экспериментах референс-штаммы не разжижали желатин. О/Ф тест был положительным. Липолитическая (твиназная) активность регистрировалась, лецитиназная активность не фиксировалась. Изучаемые бактериальные штаммы образовывали леван, индол не выделяли, не росли на МПА при температуре 41°C. Ферментировали сахарозу, глюкозу, сорбит и маннозу. Тест на мацерацию через 24 часа – результат отрицателен. Реакция на гиперчувствительность положительная, что соответствует литературным данным [3, 10]. Экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что выделенные штаммы *Pseudomonas syringae* обладают типовыми свойствами.

Заключение. Изучение эффективности применения сконструированного фагового биопрепарата для индикации *Pseudomonas syringae* в пробах семенного материала и растительной продукции на примере огурца показало, что реакция нарастания титра фага не уступает по эффективности бактериологическому методу выделения и идентификации вышеназванных бактерий. Очевидна также экономия расходных материалов и трудозатрат при ее постановке по сравнению с бактериологическим методом. Необходимо также отметить и сокращение времени исследования с 192 часов до 23 часов.

Библиографический список:

1. Маркетинговое исследование «Анализ рынка овощей закрытого грунта 2012-2018 гг.» // «EVENTUS Consulting», 2019. – 43с. – URL: <http://bp-eventus.ru/pdf/3902.pdf> - дата обращения 14.08.2020.

2. Arabiat, S. First Report of *Pseudomonas syringae* pv. aptata Causing Bacterial Blight of Sugar Beet (*Beta vulgaris*) in Oregon / S. Arabiat [and oth.] // Plant Disease. - 2016. -V. 100. - № 11. - P. 2334.

3. Koike, S.T. First Report of Bacterial Leaf Spot of Swiss Chard Caused by *Pseudomonas syringae* pv. aptata in California / S.T. Koike [and oth.] // Plant Disease. - 2003. - V. 87. - № 11. - P. 1,397.2.

4. Экологические особенности фагов фитопатогенных бактерий *Pseudomonas* на посевах сахарной свеклы / Е.Н. Андрийчук, Л.И. Семчук, С.А. Ромашев и др. // Актуальні проблеми ботаніки, екології та біотехнології (27-30 вересня, 2006 р., м. Київ). – Київ: Фітосоціоцентр, 2006. – С. 129.

5. Характеристика бактериофагов фитопатогенных бактерий / А.Д. Герасимович, Г.И. Новик, Э.И. Коломиец // Микробные технологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2012. - Том. 4. – С. 140-153.

6. ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов (с Изменением № 1) – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200022785> - дата обращения: 15.03.2020.

7. Feoktistova, N.A. Modification of method of bacillus anthracis setting phage indication in samples of soil/ N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, C.N. Zolotukhin [and oth.] // Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences.- 2018.- T. 20. № 3.- С. 734-737.

8. Разработка схемы бактериологической идентификации *Pseudomonas syringae* и её применение/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.К. Беккалиева// Биология – наука XXI века. Сборник тезисов 24-ой Международной

Пущинской школы-конференции молодых ученых.- 2020.- С. 441.

9. Morris, C.E. The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France / C.E. Morris [and oth.] // Phytopathology. -2000. - Vol. 90. - P. 636-646.

10. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X.F. Xin, B. Kvitko, S.Y. He // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Vol. 16. – №. 5. – P. 316.

INVESTIGATION OF EFFECTIVENESS OF PHAGE BIOLOGIC PREPARATION FOR *PSEUDOMONAS SYRINGAE* INDICATION IN PLANT RAW MATERIALS

Feoktistova N.A., Suldina Ye.V., Vasiliev D.A., Espembetov B. A.

Key words: *Pseudomonas syringae*, phage biopreparation, indication, cucumbers, bacteriological scheme, seeds.

*The article presents the results of research on the effectiveness of using a phage biologic preparation consisting of 2 bacteriophages Ps.s-27 UIGAU and Ps.s-7 UIGAU to indicate *Pseudomonas syringae* in seed material and plant raw materials using the example of cucumber. It was found that the reaction of phage titer growth is not inferior in efficiency to the bacteriological method of isolation and identification of the above bacteria. The savings in consumables and labor costs when it is staged compared to the bacteriological method are also obvious. A reduction in study time from 192 hours to 23 hours should also be noted.*