

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ PSEUDOMONAS SYRINGAE¹

THE STUDY OF SOME PROPERTIES OF THE ISOLATED BACTERIOPHAGES OF PSEUDOMONAS SYRINGAE

**A. Bekkaliyeva
N. Feoktistova
D. Vasilyev**

Summary. The article showed the results of a study of bacteriophages of *Pseudomonas syringae*. The optimal ratio was found to be 1: 1, i.e. 0.2 ml of phage per 0.2 ml of indicator culture. The passage time is from 3.5 hours to 5 hours of incubation at a temperature of 28 ± 2 °C. Bacteriophages isolated and selected by us showed different sensitivity to the effects of temperature in the range of 58–62 °C for 30 minutes. We found that all bacteriophages are resistant to chloroform for more than 70 minutes.

Keywords: bacteriophage, *Pseudomonas syringae*, resistance, passage.

Беккалиева Айдын Канатовна

Аспирант, ФГБОУ ВО «Ульяновский ГАУ имени

П. А. Столыпина»

aidyn_kanatovna@mail.ru

Феоктистова Наталья Александровна

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Ульяновский ГАУ имени

П. А. Столыпина»

feokna@yandex.ru

Васильев Дмитрий Аркадьевич

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Ульяновский ГАУ имени

П. А. Столыпина»

dav_ul@mail.ru

Аннотация. В статье были показаны результаты исследования бактериофагов *Pseudomonas syringae*. Было установлено оптимальное соотношение — 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры. Время пассажа — от 3,5 часов до 5 часов инкубирования при температуре 28 ± 2 °C. Выделенные и селекционированные нами бактериофаги показали разную чувствительность к воздействию температуры в диапазоне 58–62 °C в течение 30 минут. Нами было установлено что все бактериофаги устойчивы к воздействию хлороформа больше 70 минут.

Ключевые слова: бактериофаг, *Pseudomonas syringae*, устойчивость, пассаж.

С середины прошлого столетия бактериофагов стали широко использовать для диагностики различных бактериальных инфекции. На данный момент многие исследователи проявляют все больше интереса и используют на практике бактериофагов позволяющих дифференцировать возбудителей бактериальных видов [1,2,3,4]

Бактериофаги повсюду 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 [5, 6]. Эволюция устойчивости к паразитам является фунда-

ментально важной для экологии болезней, однако мы по-прежнему не можем предсказать, когда и как будет развиваться резистентность [7, 8]. Это в значительной степени обусловлено контекстно-зависимым характером взаимодействия хозяина с паразитом, поскольку польза от устойчивости будет зависеть от абиотической и биотической среды. 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 [9, 10, 11].

Цель исследований

Изучение некоторых биологических свойств выделенных бактериофагов *Pseudomonas syringae*.

¹ Исследования проводятся при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект «Фундаментальные основы разработки фагового препарата, специфичного для *Pseudomonas syringae*, и прикладные аспекты его применения для фагоидентификации и биопроцессинга пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья» № 19–44–730014

Объекты и методы исследований

Для исследования мы использовали штамм бактерии *Pseudomonas syringae* B-10917 (полученный из коллекции БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИ-генетика) и штамм *Ps.s* № 3 (полученный из коллекции музея кафедры «МВЭиВСЭ» Ульяновского ГАУ). Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой ((ГРМ-бульон) г. Оболensk Московская область Серпуховской район), Трихлорметан стабилизированный 0,6–1% этанола (хлороформ) ч.д.а. ТУ 2631–066–44493179–01. Бактериофаги вида *Pseudomonas syringae*: 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.

Изучение биологических свойств фагов проводили по методам В. Я. Ганюшкина, Э. Каттер, Д. А. Васильева [2].

Литическую активность определяли по методам Грация и Аппельману [12]. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета программ Statistica Desktop 13 Russian (for Windows; StatSoft Russia (TIBCO USA), Microsoft Excel 2010).

Результаты исследований

Все выделенные бактериофаги хранятся в виде фаголизата бульонной культуры в закупоренных стеклянных флаконах или в пробирках с резиновой пробкой при температуре 2–4°C. Они представляют собой прозрачную жидкость соломенно-желтого цвета. В результате исследований мы определили оптимальное соотношение бактериофага и индикаторного штамма. Для подбора оптимального соотношения применили следующие варианты: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 и 1:5. Было установлено соотношение 1:1 (0,2 мл бактериофага на 0,2 мл индикаторной культуры) самым оптимальным.

Литическая активность изучаемых бактериофагов бактерий *Pseudomonas syringae* составила по Аппельману от 10^{-4} до 10^{-8} ; по Грация от $1,0 \pm 0,1 \cdot 10^6$ до $2,0 \pm 0,1 \cdot 10^9$ (БОЕ/мл). Литическую активность бактериофагов *Pseudomonas syringae* по Аппельману и по Грация мы проверяли каждые три месяца. Эмпирическим методом выяснилось что бактериофаги: Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-27 УлГАУ не изменяют свою литическую активность через год хранения. А у бактериофагов: Ps.s-1 УлГАУ, Ps.s-8, Ps.s-13 УлГАУ, Ps.s-15 УлГАУ, Ps.s-30 УлГАУ, Ps.s-77 УлГАУ при хранении 2–4°C после 12 месяцев литическая активность незначительно снизилась на 2 титра.

Были изучены устойчивость к высоким температурам выделенных бактериофагов и индикаторных штаммов в диапазоне 40–64°C. Индикаторные культуры и бактериофаги прогревали в течение 30 минут на водяной

бане. После прогревания бактериальные штаммы сеяли на чашки с МПА, оставляли в термостате на сутки при оптимальной температуре (28°C). Устойчивость бактериофагов к воздействию высоких температур после прогревания определяли методом стекающей капли на наличие лизиса. Экспериментальным путем установлено что штаммы индикаторных культур инактивируются при 44 градусах, а бактериофаги более устойчивы к высоким температурам. Выделенные нами бактериофаги инактивируются следующим образом: Ps.s-27 УлГАУ при 58°C; Ps.s-1 УлГАУ Ps.s-8, УлГАУ, Ps.s-15 УлГАУ, Ps.s-30 УлГАУ, Ps.s-77 УлГАУ при 60°C; Ps.s-7 УлГАУ, Ps.s-13 УлГАУ при 62°C. Устойчивость к высоким температурам бактериофагов *Pseudomonas syringae* средне статистическое $60 \pm 2^\circ\text{C}$.

В ходе исследования мы определили чувствительность бактериофагов и индикаторных штаммов к воздействию хлороформа. Для определения мы брали соотношение фага, штамм культуры и хлороформа 1:10, время экспозиции от 5 минут до 70 минут с интервалом времени 5 минут. Пробирки с опытом встряхивали и отстаивали в течение 1/5 временного интервала воздействия, после отбирали надосадочную жидкость и высевали обработанный бактериофаг на МПА методом «дорожки». С индикаторными штаммами ход работы был такой же как и с бактериофагами, только после обработки высевали на чашках с МПА. Посевы культивировали в условиях термостата в течение 24 часов при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Наличие зоны лизиса в виде «дорожки» свидетельствует об устойчивости фагов к воздействию хлороформа.

Нами было установлено что бактериофаги *Pseudomonas syringae* не выдерживают температуры больше 62°C. Зона лизиса в дорожках температуры выше 56°C слабее.

В экспериментах также определено, что вегетативные формы индикаторных культур *Pseudomonas syringae* не выдерживают воздействие хлороформа при временной экспозиции 5–70 минут. Установлено, что бактериофаги *Pseudomonas syringae* устойчивы к воздействию хлороформа. В свою очередь бактериальные культуры не выдерживают воздействия хлороформа больше 5 минут. Этот метод для нас является самым оптимальным.

Заключение

В результате исследований мы подобрали оптимальное соотношение — 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры. Время пассажа — от 3,5 часов до 5 часов инкубирования при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Выделенные и селекционированные нами бактериофаги показали разную чувствительность к воздействию темпе-

ратуры в диапазоне 58–62 °С в течение 30 минут. Нами было установлено что все бактериофаги устойчивы к воздействию хлороформа больше 70 минут. Индикаторные штаммы неустойчивы к хлороформу, микробные клетки инактивируются в течение 5 минут. Эмпирическим путем установлено, что применение хлороформа

при очистке от микробных клеток наиболее предпочтительно. Полученные результаты свидетельствуют, что изучаемые бактериофаги, строго специфичны в пределах вида *Pseudomonas syringae* и, в перспективе, могут входить в состав биопрепарата для его индикации и идентификации бактерии вида *Pseudomonas syringae*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лыдина М. А. и др. Бактериофаги рода *Proteus*: биологические свойства и практическое применение // Достижения молодых ученых в ветеринарную практику. — 2016. — С. 125–133
2. Васильев Д. А. Антология научно-методических материалов по изучению бактериофагов. / Васильев Д. А., Золотухин С. Н. — Ульяновск, УГСХА; 2017. — С. 2011
3. Diard M. et al. Inflammation boosts bacteriophage transfer between *Salmonella* spp // *Science*. — 2017. — Т. 355. — № . 6330. — С. 1211–1215
4. Rauch B. J. et al. Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins // *Cell*. — 2017. — Т. 168. — № . 1–2. — С. 150–158. e10
5. Koskella B., & Taylor, T. B. (2015): The potential role of bacteriophages in shaping plant-bacterial interactions. *Bacteria-Plant Interactions: Advanced Research and Future Trends*, 199–220.
6. Kandel P., & Hockett, K. (2019): Evidence of physiological tolerance and heterogenous resistance to a phage-tail like bacteriocin in *Pseudomonas syringae*. *Plant Health* 2019
7. Koskella, B., & Taylor, T. B. (2018): Multifaceted impacts of bacteriophages in the plant microbiome. *Annual review of phytopathology*.
8. Atanasova, N. S., Senčilo, A., Pietilä, M. K., Roine, E., Oksanen, H. M., & Bamford, D. H. (2015): Comparison of lipid-containing bacterial and archaeal viruses. In *Advances in virus research* (Vol. 92, pp. 1–61). Academic Press.
9. De Smet, J., Hendrix, H., Blasdel, B. G., Danis-Wlodarczyk, K., & Lavigne, R. (2017): *Pseudomonas* predators: Understanding and exploiting phage–host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 15(9):517.
10. Hernandez, C. A., & Koskella, B. (2019): Phage resistance evolution in vitro is not reflective of in vivo outcome in a plant-bacteria-phage system. *Evolution*.
11. Park, J., Lim, J. A., Yu, J. G., & Oh, C. S. (2018): Genomic Features and Lytic Activity of the Bacteriophage PPPL-1 Effective against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, a Cause of Bacterial Canker in Kiwifruit. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(9):1542–1546
12. Васильев Д. А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоназа рыб. / Васильев Д. А., Викторов Д. А., Богданов И. И. // *Естественные и технические науки*. 2011, № 2 (52). — С. 79–82

© Беккалиева Айдын Канатовна (aidyn_kanatovna@mail.ru),

Феоктистова Наталья Александровна (feokna@yandex.ru), Васильев Дмитрий Аркадьевич (dav_ul@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»