

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИИ МЯГКОЙ ГНИЛИ

APPLICATION OF THE REACTION OF THE GROWTH OF PHAGES TITER FOR DETECTION OF SOFT ROT BACTERIA

**B. Ryskaliyeva
D. Vasilyev
N. Feoktistova
E. Lyashenko**

Summary. The article shows the results of studies using the phage titer increasing reaction to detect the phytopathogenic bacterium *Pectobacterium carotovorum*, which causes soft rot and black leg of potato. In seed potatoes contaminated with bacteria of the genus *Pectobacterium*, using the phage titer increase reaction, the studied bacteria are detected in the amount of 103 microbial cells per 1 g without isolation of pure culture, in the presence of extraneous microflora. The data obtained during the study confirm that for the detection of bacteria of the genus *Pectobacterium*, the use of the phage titer increase reaction is an effective method that does not require isolation of a pure culture and allows to reduce the duration of the study to detect them.

Keywords: phytopathogenic bacteria, *Pectobacterium carotovorum*, identification, phage titer increase reaction, bacteriophage, soft rot.

Рыскалиева Балдай Жанайдаровна

Аспирант, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина»
bryskalieva@mail.ru

Васильев Дмитрий Аркадьевич

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина»
dav_ul@mail.ru

Феоктистова Наталья Александровна

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина»
feokna@yandex.ru

Ляшенко Елена Анатольевна

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина»
elena-l18@mail.ru

Аннотация. В статье показаны результаты исследований применения реакции нарастания титра фагов для обнаружения фитопатогенной бактерии *Pectobacterium carotovorum*, вызывающей мягкую гниль и черную ножку картофеля. В семенном картофеле, контаминированном бактериями рода *Pectobacterium*, с помощью реакции нарастания титра фага изучаемые бактерии обнаруживаются в количестве 103 микробных клеток в 1 г без выделения чистой культуры, в присутствии посторонней микрофлоры. Полученные в ходе исследования данные подтверждают, что для обнаружения бактерий рода *Pectobacterium* использование реакции нарастания титра фага является эффективным методом не требующим выделения чистой культуры и позволяющим сокращать длительность исследования по их обнаружению.

Ключевые слова: фитопатогенные бактерии, *Pectobacterium carotovorum*, идентификация, реакция нарастания титра фага, бактериофаг, мягкая гниль.

Введение

Черная ножка наиболее вредоносная бактериальная болезнь картофеля, встречающаяся повсеместно и проявляющаяся в виде некроза прикорневой части стеблей растений и мягкой гнили посадочных и хранящихся клубней. Эту болезнь вызывают три вида пектолитических бактерий из семейства *Enterobacteriaceae*: *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc, син. *Erwinia carotovora subsp. carotovora*); *P. atrosepticum* (Pa, син. *E. carotovora subsp. atroseptica*); *Dickeya spp.* (D, син. *E. chrysanthemi* или *P. chrysanthemi*). Первые два вида широко встречаются как патогены картофеля на пространстве бывшего СССР [1].

Бактерии *Pectobacterium carotovorum* факультативные патогены, штаммы которых вызывают заболевания у различных видов растений, в том числе важных сельскохозяйственных культур, во многих случаях наносят большой экономический ущерб [2,3,4]. Ежегодные потери урожаев сельскохозяйственных культур примерно составляют 10–15%, в годы эпифитотии превышают 50% [5].

Из *Pectobacterium spp.* опасными для картофеля являются подвиды *Pectobacterium subsp. carotovorum* и *P.c.subsp. brasiliensis*. По сравнению с *Pectobacterium atrosepticum*, у *Pectobacterium subsp. carotovorum* шире географическое распространение, а также спектр растений-хозяев [6].

Таблица 1. Результат реакции нарастания титра фага при исследовании контаминированного бактериями рода *Pectobacterium carotovorum* семенного материала картофеля

Концентрация индикаторных штаммов	Бактериофаги			
	РСС-1 УлГАУ		РСС-37 УлГАУ	
	Количество колоний фага	Увеличение количества фага	Количество колоний фага	Увеличение количества фага
10 ¹	9	0,56	12	0,32
10 ²	14	0,87	17	0,45
10 ³	98	6,12	213	5,75
10 ⁴	лизис	Более 20 раз	лизис	Более 20 раз
10 ⁵	лизис	Более 20 раз	лизис	Более 20 раз
Контроль	16	0	37	0
Свободный фаг	0	0	0	0

Инфекции, вызванные *P. carotovorum subsp. carotovorum* приводят к обширной мацерации из-за производства ферментов, таких как протеаза и пектиназа, что приводит к гибели клеток [7].

Диагностика и идентификация патогенов важны во многих отраслях, при контроле за состоянием окружающей среды и т.д. Вирусам, бактериозам, гельминтозам, микозам подвержены все растения. В сельском хозяйстве это грозит большими потерями. При заражении урожайность снижается в пределах от 10 до 80%, уменьшается содержание крахмала, ухудшается их качество, а также товарный вид. Продовольственная и биологическая безопасность зависит от постоянного контроля над фитосанитарным состоянием не только окружающей среды, но и сельскохозяйственных растений. Основным методом осуществления контроля — высокоспецифичная, эффективная диагностика, и идентификация фитопатогенов [8].

Специфическое взаимодействие фагов с бактериальной клеткой-хозяином дает возможность применять их для идентификации бактерий, в том числе патогенных. В отличие от множества искусственно созданных систем для определения и дифференциации различных структур бактериальных клеток, основанных на использовании антител или на амплификации, бактериофаг, естественно возникнув в ходе эволюции, специфически распознает свои рецепторы и связывается только с клетками своего хозяина. Это взаимодействие используется в ряде разных методик специфического определения и дифференциации штаммов бактерий — хозяев бактериофагов [9].

Цель исследования — применение реакции нарастания титра фага для индикации и идентификации возбудителя мягкой гнили с применением специфического бактериофага.

Объектами исследования выступали образцы семенного и товарного картофеля, нативные и искусственно контаминированные (зараженные) бактериями *Pectobacterium carotovorum*. В работе были использованы штаммы бактерий *Pectobacterium carotovorum* В-3455, В-333 из коллекции музея кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Выделенные и селекционированные авторами статьи бактериофаги *Pectobacterium carotovorum* [10].

Материалы и методы исследования

Постановка реакции нарастания титра фага проводилась по методике, предложенной В.Я. Ганюшкиным, а также методиками, которые были опробированы сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ [11, 12, 13].

Результаты исследования

В таблице 1 представлены результаты реакции нарастания титра фага при исследовании контаминированного бактериями рода *Pectobacterium carotovorum* семенного материала картофеля (табл. 1)

Установлено, что увеличение титра фагов РСС — 1 УлГАУ и РСС — 37 УлГАУ более чем в 5–6 раз произошло

при концентрации 10^3 микробных клеток в 1 г семенного материала картофеля.

Выводы

В семенном картофеле, контаминированном бактериями рода *Pectobacterium*, с помощью реакции нарастания титра фага изучаемые бактерии обнаруживаются в количестве 10^3 микробных клеток в 1 г без вы-

деления чистой культуры, в присутствии посторонней микрофлоры.

Полученные в ходе исследования данные подтверждают, что для обнаружения бактерий рода *Pectobacterium* использование реакции нарастания титра фага является эффективным методом не требующим выделения чистой культуры и позволяющим сокращать длительность исследования по их обнаружению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карлов, А. Н. Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola*. А. Н. Карлов, А. Н. Игнатов, Г. И. Карлов, Э. Ш. Пехтерева, Е. В. Матвеева, Н. В. Шаад, Ю. А. Варицев, Ф. С. Джалилов. Известия ТСХА, выпуск 3, 2011. с. 38–48.
2. Чжань, Янь. Зависимость иммунного ответа растений *Solanum lycopersicum* от численности клеток *Pectobacterium carotovorum* / Янь Чжань, Е. А. Николайчик // Известия национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. — 2012. — № 3. — С. 44–48.
3. Николайчик, Е. А., Л. Л. Хомская, Е. И. Игнатенко. Фитопатоген *pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения –хозяина. Труды БГУ 2009. Том 4. Часть 1.
4. Николайчик, Е. А. Индукция и супрессия иммунного ответа растений бактериальным патогеном *Pectobacterium carotovorum* / Е. А. Николайчик // Труды БГУ.— 2012.— Том 7.— Часть 1–2.— С. 43–55.
5. Стацюк Н. В. Лабораторные методы оценки устойчивости растений и клубней картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили клубней. Н. В. Стацюк, М. А. Кузнецова. Сельскохозяйственная биология. 2018. Том: 53. № 1. С. 111–122.
6. Ерохова, М. Д. «Черная ножка» и бактериальная мягкая гниль картофеля: факты и новейшие сведения. Защита и карантин растений. № 2, 2016, с. 31–33.
7. Nazerian E., Sijam K., Abidin Z., Ahmad M., Vadamalai G. [Электронный ресурс] Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as a new disease on Lettuce in Malaysia. Australasian Plant Dis. Notes, 2013. № 8 December 2013, Volume 8, Issue 1, pp 105–107. Режим доступа: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13314-013-0107-9> (дата обращения: 23. 07.2019)
8. Рязанцев, Д. Ю. Диагностика карантинных фитопатогенов методом пцр в формате flash Д. Ю. Рязанцев, Д. Д. Абрамов, С. К. Завриев. Сельскохозяйственная биология, 2009, № 3, С. 14–117.
9. Чугунова Е. О., Татарникова Н. А. Применение бактериофагов для детекции бактерий (обзор литературы) // Пермский аграрный вестник. 2016. № 4 (16). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/primeneniye-bakteriofagov-dlya-detektsii-bakteriy-obzor-literatury> (дата обращения: 24.10.2019).
10. Выделение фагов и характеристика основных биологических свойств бактериофага фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum* / Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Е. А. Ляшенко, Н. И. Молофеева, И. И. Богданов, Б. Ж. Рыскалиева, А. К. Беккалиева, П. С. Майоров, А. И. Калдыркаев, И. Л. Обухов, Б. И. Шморгун // Естественные и технические науки. — 2018. — № 11. — С. 47–51.
11. Ганюшкин, В. Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. — Ульяновск, 1988. — 45 с.
12. Васильев, Д. А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, А. В. Алешкин, Н. А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. — 2012. — № 4 (20). — С. 69–73.
13. Васильев, Д. А., Феоктистова, Н. А., Алешкин А. В. Золотухин, С. Н., Мاستиленко, А. В., Кисилева, И. А., Сульдина, Е. В., Никитченко, Д. В. (2019): Разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов (биопроцессинг). Научная монография. — Ульяновск. — 450 с.

© Рыскалиева Балдай Жанайдаровна (bryskalieva@mail.ru), Васильев Дмитрий Аркадьевич (dav_ul@mail.ru), Феоктистова Наталья Александровна (feokna@yandex.ru), Ляшенко Елена Анатольевна (elena-118@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»