

УДК 579

ТЕСТИРОВАНИЕ СХЕМ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГА ПРИ БИОКОНТРОЛЕ *YERSINIA ENTEROCOLITICA* В РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ

*А.В. Родионова, магистрант 2 года обучения факультета
ветеринарной медицины и биотехнологии*

*Е.В. Сульдина, ассистент,
тел. 8(8422) 55-95-47, e.suldina2006@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

Ключевые слова: *Yersinia enterocolitica*, бактериофаг, фаг, био-
контроль.

В статье представлены исследования по подбору и тестированию схем применения иерсиниозного бактериофага Ye3-f2 для биологического контроля *Yersinia enterocolitica* в растительной продукции.

Введение. *Y. enterocolitica* - бактерии семейства *Enterobacteriaceae* рода *Yersinia*. Местом обитания этих микроорганизмов являются почва, вода, растения и др [1-2]. Данный вид является условно-патогенным микроорганизмом и способен вызывать кишечный иерсиниоз. Основные пути передачи этого заболевания – вода, молоко, пищевое сырье и продукты питания растительного и животного происхождения [3-4]. Вирулентные бактериофаги, являются потенциально перспективными агентами биоконтроля *Yersinia enterocolitica* в пищевом сырье и продуктах питания растительного и животного происхождения [5-6].

В связи с этим целью данной работы является подбор наиболее подходящей схемы применения бактериофага при биоконтроле *Yersinia enterocolitica* в растительной продукции.

Материалы и методы. Штамм *Yersinia enterocolitica* 9, бактериофаг Ye3-f2, лук, питательные среды и реактивы.

При работе с микроорганизмами использовали стандартные бактериологические методы.

Результаты исследования. Исследование по наиболее оптимальному способу применения бактериофага для обработки растительной продукции проводили *in vitro* в условиях микробиологического бокса.

Перед посадкой луковицу контаминировали суточной культурой *Yersinia enterocolitica* и обрабатывали одним из способов:

1. Контроль без добавления культуры и фага

2. Обработка фагом Ye3-f2 перед посадкой без культуры
3. Контаминация без добавления фага
4. Выдерживание в растворе фага Ye3-f2 в течение 30 минут
5. Замачивание перед посадкой и опрыскивание в вегетацию
6. Опрыскивание фагом Ye3-f2 перед посадкой
7. Двукратное опрыскивание фагом Ye3-f2 после посадки
8. Трехкратное опрыскивание фагом Ye3-f2 после посадки
9. Полив раствором фага фагом Ye3-f2
10. Выращивание в воде с добавлением фага Ye3-f2

После 2 недельного выращивания у луковицы отрезали перья и перетерли в ступке с физиологическим раствором. Отбирали по 1 мл жидкости в МПБ и помещали в термостат на 24 часа при 37 °С. Отобранные пробы с корней и разрезанных луковиц также заседали в МПБ и культивировали в течение суток. Данные манипуляции позволят нам оценить распространение бактерий по растению в период вегетации и оценить способность, как микроорганизма, так и бактериофага проникать во все части растения.

Через 24 часа пробы пересевали на И-агар. Результаты посевов проб отобранных из центральной части луковицы представлены на рисунках 1-4.

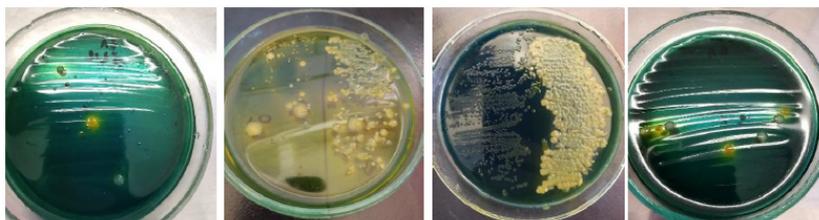


Рисунок 1 -
Рост пробы №1 с
луковицы
(контроль)

Рисунок 2 -
Рост проб №3,
№4 с луковицы

Рисунок 3 -
Рост проб №5,
№7 с луковицы

Рисунок 4 -
Рост пробы №6 с
луковицы

С посевов отобрали наиболее подходящие к *Yersinia enterocolitica* по описанию колонии, сделали мазки и окрасили их по Граму. В мазках все пробы были представлены грамотрицательными палочками различного размера (рис 5-10).



**Рисунок 5 -
Мазок пробы №1**

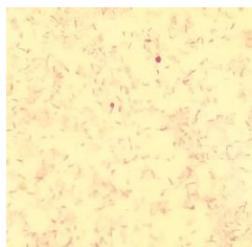


**Рисунок 6 -
Мазок пробы №3**

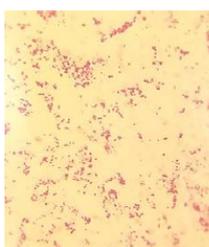


**Рисунок 7 -
Мазок пробы №4**

Параллельно произвели посевы проб отобранных с корней и перьев лука на селективный агар для иерсиний. Через 24 часа рост с перьев лука наблюдался только в пробе №3, в пробах с корней наблюдался рост на всех чашках (рис. 11-16).



**Рисунок 8 -
Мазок пробы №5**



**Рисунок 9 -
Мазок пробы №6**



**Рисунок 10 -
Мазок пробы №7**

С И-агара отбирали колонии, подходившие под описание *Yersinia enterocolitica*, делали мазки и окрашивали по Граму. Проба №3 с перьев в мазках представлена грамотрицательными палочками. Пробы № 1,3,4,5,6,7 с корней – грамотрицательные палочки.

После окрашивания, колонии отбирали в МПБ и культивировали в

условиях термостата. Культуры микроорганизмов подвергали дальнейшей идентификации. Наличие бактерий вида *Yersinia enterocolitica* подтвердилось в пробах №3 и №9.

Параллельно отобранные пробы подвергали исследованию на присутствие бактериофага. Фаголизат пропускали через фильтровальную бумагу и очищали от жизнеспособных бактериальных клеток с помощью трихлорметана. Полученную надосадочную жидкость исследовали на присутствие бактериофага методом Отто и Грациа.

Через 24 часа присутствие бактериофага было установлено в пробах № 2 и №6 с корней, перьев и сердцевин луковицы. Присутствие бактериофага определяли по наличию прозрачных зон лизиса, хорошо видимых на матовом фоне роста индикаторной культуры. В других пробах наличие бактериофага не выявлено.

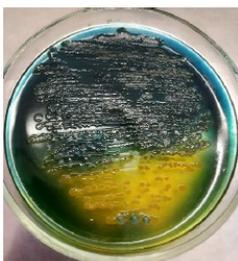


Рисунок 11 -
Рост пробы №1 с
корней

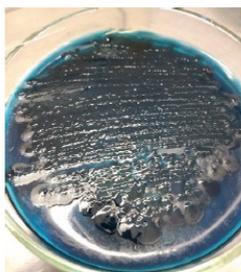


Рисунок 12 -
Рост пробы №3 с
корней

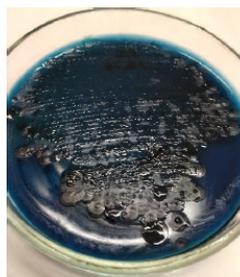


Рисунок 13 -
Рост пробы №4 с
корней

Заключение. По результатам исследования установлено, что при контаминации лука бактериями вида *Yersinia enterocolitica*, микроорганизм можно выделить, из всех частей растения, в т.ч. зелени.

Нами протестировано 6 схем применения иерсиниозного бактериофага *Ye3-f2* для биоконтроля *Yersinia enterocolitica* в растительной продукции и установлено, что наиболее оптимальной и перспективной для дальнейшего изучения является схема, при которой растение опрыскивают бактериофагом перед посадкой.

Библиографический список:

1. Ефимочкина Н.Р. Роль физико-химических и биологических воздействий в формировании толерантности бактерий, контаминирующих пищевые продукты // Журн. микробиол. 2009. № 4. С. 120 - 125.
2. Сульдина Е.В. Выделение бактерий и бактериофагов *Yersinia enterocolitica* / Е.В. Сульдина, Д.А.Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2017. - № 3 (39). - С. 50-55.
3. Литвин В.Ю., Сомов Г.П., Пушкарева В.И. Сапронозы как природноочаговые болезни // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 1. С. 10 - 16.
4. Выделение *Yersinia enterocolitica* из окружающей среды и пищевых продуктов //Актуальные проблемы аграрной науки: состояние и тенденции развития: материалы Национальной научно-практической конференции. 2 декабря 2019 г.-Димитровград: Технологический институт-филиал ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2019. – УлГАУ, 2019.
5. Васильев Д. А. и др. Протеомный анализ бактериофага YE 3-f2, специфичного для бактерий *Yersinia enterocolitica* //Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – №. 2. – С. 132-139.
6. Сульдина Е. В. и др. ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ *Y. ENTEROCOLITICA* И СЕЛЕКЦИЯ КЛОНОВ //Universum: химия и биология. – 2017. – №. 7. – С. 4-7.
Родионова А. В., Сульдина Е. В.

**TESTING OF SCHEMES OF APPLICATION OF
BACTERIOPHAGE AT THE BIOCONTROL OF YERSINIA
ENTEROCOLITICA IN PLANT PRODUCTS**

Rodionova A.V., Suldina E.V.

Key words: Yersinia enterocolitic, bacteriophage, phage, biocontrol.

The article presents studies on the use of the isirinous bacteriophage Ye3-f2 for the biological control of Yersinia enterocolitica in plant products