

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки)

doi:10.18286/1816-4501-2024-2-136-142

УДК 602.3:579.6

**Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов *Pseudomonas syringae* для целей конструирования биологического дезинфицирующего средства**

П. С. Майоров<sup>✉</sup>, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Е. В. Сульдина, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Н. А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017. г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8

<sup>✉</sup>pavelmayorovv@yandex.ru

**Резюме.** В статье описаны результаты исследований по изучению биологических свойств выделенных и селекционированных бактериофагов, активных в отношении бактерий *P. syringae* с целью отбора перспективного штамма для конструирования биологического дезинфицирующего средства. Специфические бактериофаги изучали по показателям: морфология бляшкообразующих единиц, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, устойчивость к физическим факторам (температура) и химическим веществам (трихлорметан). Изучены биологические свойства 7 изолятов бактериофагов, выделенных из растений с признаками заболевания и объектов внешней среды. Установлено, что все выделенные бактериофаги формировали округлые колонии различного диаметра, характеризовались различными показателями литической активности ( $10^6$ - $10^9$  БОЕ/мл) и спектра литического действия (71 % до 100 % использованных в работе штаммов бактерий). Бактериофаги обладали строгой специфичностью в пределах вида и имели различный уровень устойчивости по отношению к физическим и химическим факторам. Эмпирически установлено, что метод фильтрации с использованием фильтров с диаметром пор 0,22 мкм максимально эффективен для очистки бактериофагов. На основании изученных биологических свойств для конструирования биопрепарата был выбран бактериофаг 7ф-УлГАУ, характеризовавшийся максимально высоким показателем литической активности, которая составила  $10^9$  БОЕ/мл и сохранялась в процессе хранения бактериофага при температуре 4 °С в течение 6 мес.; лизировал максимальное количество штаммов бактерий *Pseudomonas syringae*, был строго специфичным по отношению к целевому микроорганизму.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas syringae*, фитопатоген, дезинфекция, биологическая дезинфекция, пищевой патоген, фаг, бактериофаг, бактерии.

**Для цитирования:** Майоров П. С., Сульдина Е. В., Феоктистова Н. А. Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов *Pseudomonas syringae* для целей конструирования биологического дезинфицирующего средства // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2024. №2 (66). С. 136-142. doi:10.18286/1816-4501-2024-2-136-142

**Study of the biological properties of isolated *Pseudomonas syringae* bacteriophages for the purpose of designing a biological disinfectant**

P. S. Maiorov<sup>✉</sup>, E. V. Suldina, N. A. Feoktistova

FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

432017 Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard 1

<sup>✉</sup>pavelmayorovv@yandex.ru

**Abstract.** The work was carried out in order to study the biological properties of a collection of isolated bacteriophages active against *P. syringae* bacteria, for further selection of the most promising strain with the possibility of its use as part of the biological disinfectant being developed. Biological properties such as: morphology of negative colonies; lytic activity; spectrum of lytic activity; specificity of action; temperature stability; resistance to chloroform were studied in the



isolated bacteriophages. Seven strains of bacteriophages isolated from affected plants and environmental objects were used. All the studied phages formed rounded colonies of various sizes, had different levels of lytic activity in the range of  $10^6$ - $10^9$  PFU/ml and a spectrum of lytic action from 71% to 100% of the bacterial strains used in the work. Bacteriophages had strict specificity with respect to the target bacterium and had different levels of resistance to physical and chemical factors. Strain 7f-UIGAU was selected from the total number of bacteriophages studied. This strain had the best level of lytic activity, which was in the range of  $10^9$  BOE/ml. At the same time, the activity level was maintained during the storage of the bacteriophage for at least 6 months. The bacteriophage had a high spectrum of lytic action – it lysed all strains of *Pseudomonas syringae* bacteria used in the work. In addition, it was strictly specific to the target microorganism and had the best parameters of stability and preservation of the level of lytic activity when exposed to temperature and trichloromethane.

**Keywords:** *Pseudomonas syringae*, phytopathogen, disinfection, biological disinfection, food pathogen, phage, bacteriophage, bacteria.

**For citation:** Maiorov P. S., Suldina E. V., Feoktistova N. A. Study of the biological properties of isolated *Pseudomonas syringae* bacteriophages for the purpose of designing a biological disinfectant // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2024;2(66): 136-142 doi:10.18286/1816-4501-2024-2-136-142

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2023 году. Номер ЕГИСУ НИОКТР 1022040900033-0-1.6.2

### Введение

Существуют проблемы в обнаружении, диагностике и контроле бактериальных патогенов растений, таких как *P. Syringae*, одной из которых является необходимость быстрой и достоверной индикации и идентификации бактериальных патогенов растений. Однако традиционные методы исследований, такие как изучение физиолого-биохимических свойств или детекция патогена с помощью полимеразной цепной реакции, согласно протоколу проводятся в течение нескольких суток, или требуют дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала [1, 2]. Другой проблемой является воздействие фитопатогена на растительное сырье и продукты питания в процессе хранения, что снижает их товарные характеристики и приводит к экономическим потерям. Бактериальные патогены растений подвергаются влиянию различных внешних факторов (температура окружающей среды, влажность и т.д.) [3, 4]. Следовательно, затрудняются возможности контроля бактериальных заболеваний, поскольку эффективные меры борьбы могут варьироваться в зависимости от конкретных условий окружающей среды. Диагностика инфекции и протокол контрольных мероприятий требуют разработки эффективных методик, позволяющих в ускоренные сроки не только идентифицировать фитопатогенный микроорганизм, но и подобрать стратегию для профилактики бактериоза [5, 6].

Жизненный цикл *P. syringae* включает в себя ряд различных стадий и способов инфицирования. Вышеназванные бактерии контаминируют семена и вегетативные части растений, воду, садовый инвентарь и тару. Попав внутрь растений, *P. syringae* вырабатывает токсины [7-9]. У инфицированных растений регистрируются характерные симптомы, такие как повреждения или обесцвечивание пораженных листьев, некроз плодов. Установлено, что бактерии

*P. syringae* могут выживать в растительных остатках в окружающей среде в течение длительного времени и заражать восприимчивые растения-хозяева через раны или естественные отверстия [10, 11]. *P. syringae* являются фитопатогенными бактериями-космополитами, что, с одной стороны иллюстрирует потенциальную угрозу для различных видов сельскохозяйственных растений, а, с другой, дает возможность разработки универсального методологического приема для диагностики и профилактики бактериоза [12-14].

Применение фаговых биопрепаратов в различных методиках позволяет осуществлять биоконтроль и анализировать количественный и качественный состав лизируемых бактерий. Поскольку современные меры контроля бактериальных фитопатогенов ограничены и часто оказываются неэффективными, исследователи указывают на потенциал применения бактериофаговых биопрепаратов в рамках комплексной стратегии борьбы с фитопатогенами в данной области [15, 16].

Цель исследования – изучение биологических свойств выделенных бактериофагов, активных в отношении бактерий *P. syringae*, с целью дальнейшего отбора перспективного штамма для конструирования биологического дезинфицирующего средства.

### Материалы и методы

В исследованиях использовали: референс-штамм бактерий *P. syringae* - В-10917 (НБЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт»), штамм Ps.s.-3-УГСХА (коллекция музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ), 12 штаммов бактерий *P. syringae*, выделенных из объектов внешней среды (почва, вода) и растительного материала (образцы плодов и овощей), штаммы бактерий *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Xanthomonas campestris*, *Salmonella*



*typhimurium*, *Saimonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Proteus vulgaris* (коллекция музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ). Семь изолятов бактериофагов, активных в отношении бактерий *P. syringae*, были выделены из растительного материала и объектов внешней среды.

Изучение биологических свойств бактериофагов проводили по стандартным методикам, описанным В.Я. Ганюшкиным, И.П. Ревенко, Э. Каттер, Д.А. Васильевым [17-19].

Для изучения морфологии бляшкообразующих единиц бактериофагов осуществляли посев исследуемого бактериофага с культурой бактерий *P. syringae* в двухслойный агар по Грация и наблюдали характер роста после культивирования в течение 24 ч. при температуре 28°C.

Литическую активность бактериофагов изучали по методам Аппельмана и Грация. С целью получения достоверных результатов каждый эксперимент проводили троекратно. Учет результатов проводили через 24 ч. культивирования посевов при 28 °С.

Спектр литической активности выделенных бактериофагов изучали на 14 штаммах бактерий *P. syringae* методом спот-теста, нанося исследуемый бактериофаг на газоны бактериальных культур.

Изучение специфичности проводили методом «стекающей капли», для чего на заранее подготовленные чашки Петри с МПА наносили газон следующих видов бактерий: *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Xanthomonas campestris*, *Salmonella typhimurium*, *Saimonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Proteus vulgaris*. После подсушивания на газон культуры бактерий наносили несколько капель исследуемого бактериофага *P. syringae* и параллельно несколько капель стерильного МПБ в качестве контроля. Посевы инкубировали в течение 24 часов при 28 °С.

#### Результаты

Экспериментальным путем установлено, что используемые в работе бактериофаги на МПА формировали округлые колонии с зонами вторичного роста по внешней стороне и прозрачными центрами, диаметр колоний находился в пределах от 0,5 до 3,0 мм в зависимости от начального титра бактериофага (рис.1). Со снижением количества бляшек при уменьшении титра используемого бактериофага, у штаммов 1ф-УлГАУ, 4ф-УлГАУ, 6ф-УлГАУ и 7ф-УлГАУ наблюдали пропорциональный рост размера бляшкообразующих единиц на питательной среде.

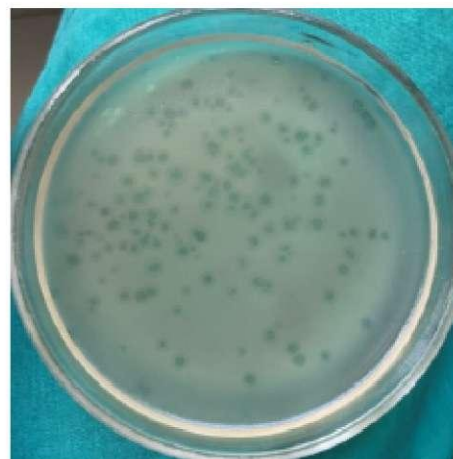


Рис. 1. Морфология бляшкообразующих единиц бактериофага *P. syringae* 2ф-УлГАУ

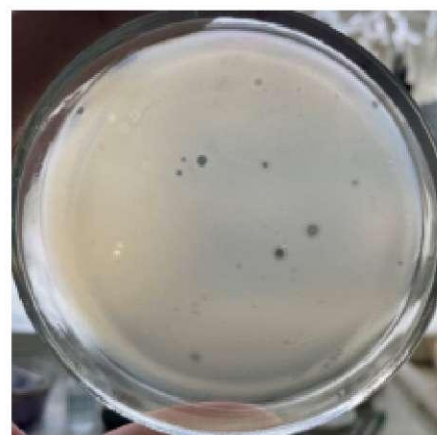


Рис. 2. Определение литической активности бактериофага *P. syringae* 5ф-УлГАУ

Литическая активность изучаемых бактериофагов *P. syringae* составила по Аппельману от  $10^{-6}$  до  $10^{-9}$ ; по Грация от  $1,0 \pm 0,1 \times 10^7$  до  $1,0 \pm 0,1 \times 10^9$  БОЕ/мл. Результаты исследований представлены в таблице 1. У большинства изолятов бактериофагов был зафиксирован схожий уровень литической активности при определении различными методами. Исключением являлся бактериофаг *P. syringae* 3ф-УлГАУ, у которого уровень литической активности, определяемый по методу по Аппельмана, составил  $10^{-6}$ , по методу Грация –  $1,0 \pm 0,1 \times 10^7$  БОЕ/мл.

Изменение литической активности в процессе хранения определяли через 3 и 6 мес. Бактериофаги хранились в виде фаголизата бульонной культуры в пробирках с резиновой пробкой при температуре  $3 \pm 1$  °С. Результаты приведены в таблице 2. Определено, что бактериофаги 3ф-УлГАУ и 7ф-УлГАУ не изменяют показатель литической активности через 6 мес. хранения. У бактериофагов 1ф-УлГАУ, 2ф-УлГАУ, 4ф-УлГАУ, 5ф-УлГАУ, 6ф-УлГАУ после 6 мес. хранения при температуре  $3 \pm 1$  °С литическая активность снизилась на 1 порядок.



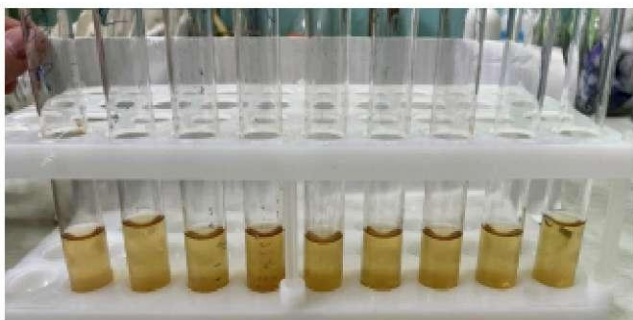


Рис. 3. Определение литической активности бактериофага *P. syringae* 7ф-УлГАУ по методу Апфельмана: слева направо 10-кратные разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  (индикаторная культура *P. syringae* Pss3,  $10^7$  КОЕ/мл)

Таблица 1. Литическая активность бактериофагов *P. syringae*, БОЕ/мл

Наименования фага	Литическая активность	
	по Апфельману	по Грация
1ф-УлГАУ	$10^{-7}$	$2,0 \pm 0,1 * 10^8$
2ф-УлГАУ	$10^{-8}$	$1,0 \pm 0,1 * 10^8$
3ф-УлГАУ	$10^{-6}$	$1,0 \pm 0,1 * 10^7$
4ф-УлГАУ	$10^{-7}$	$1,0 \pm 0,1 * 10^7$
5ф-УлГАУ	$10^{-8}$	$3,0 \pm 0,1 * 10^8$
6ф-УлГАУ	$10^{-7}$	$2,0 \pm 0,1 * 10^7$
7ф-УлГАУ	$10^{-9}$	$1,0 \pm 0,1 * 10^9$

Таблица 2. Литическая активность бактериофагов *P. syringae* в процессе хранения

N	Наименование фага	Литическая активность через 3 месяца хранения		Литическая активность через 6 месяца хранения	
		по Апфельману	по Грация	по Апфельману	по Грация
1	1ф-УлГАУ	$10^7$	$2,0 \pm 0,1 * 10^8$	$10^7$	$1,0 \pm 0,1 * 10^7$
2	2ф-УлГАУ	$10^8$	$1,0 \pm 0,1 * 10^8$	$10^7$	$1,0 \pm 0,1 * 10^7$
3	3ф-УлГАУ	$10^6$	$1,0 \pm 0,1 * 10^7$	$10^6$	$2,0 \pm 0,1 * 10^7$
4	4ф-УлГАУ	$10^7$	$1,0 \pm 0,1 * 10^7$	$10^6$	$1,0 \pm 0,1 * 10^6$
5	5ф-УлГАУ	$10^8$	$2,0 \pm 0,1 * 10^8$	$10^7$	$1,0 \pm 0,1 * 10^7$
6	6ф-УлГАУ	$10^7$	$1,0 \pm 0,1 * 10^7$	$10^6$	$3,0 \pm 0,1 * 10^6$
7	7ф-УлГАУ	$10^9$	$1,0 \pm 0,1 * 10^9$	$10^9$	$1,0 \pm 0,1 * 10^9$

Экспериментально установлено, что исследуемые бактериофаги характеризуются различным

спектром литического действия по отношению к использованным в работе штаммам бактерий, который находился в диапазоне от 71 % до 100%. Наибольшим спектром литического действия обладал бактериофаг 7ф-УлГАУ, который лизировал все используемые в работе штаммы бактерий (табл.3).

Эксперименты по определению специфичности показали их строгую специфичность по отношению к бактериям вида *Pseudomonas syringae* всех изолятов бактериофагов. Результаты отражены в таблице 4.

Дальнейшие исследования, посвященные определению устойчивости бактериофагов к воздействию температуры и трихлорметана, было принято проводить с бактериофагом 7ф-УлГАУ, поскольку он характеризовался наиболее высокими показателями литической активности и максимально широким спектром литического действия, что потенциально делает его наиболее перспективным для конструирования биопрепарата. Отметим, что полученные результаты в дальнейшем могут быть транслированы и на другие штаммы выделенных бактериофагов при необходимости их введения в состав разрабатываемого биопрепарата.

Были проведены эксперименты по изучению влияния различных методов инактивации индикаторной бактериальной культуры в фаговой суспензии на показатель литической активности бактериофага *P. syringae* 7ф-УлГАУ. Результаты исследования при заданных параметрах приведены в таблице 5.

Экспериментально установлено, что бактериофаг *P. syringae* 7ф-УлГАУ характеризуется показателями устойчивости к воздействию температуры в диапазоне 50...80 °C и трихлорметана (в концентрации 1/10, 1/20, 1/30) во временном диапазоне 10...30 мин. Однако полученные результаты показали снижение активности бактериофагов после воздействия на них физическим и химическим методами инактивации на 2...3 порядка по сравнению с фильтрацией фаговой суспензии через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм. Этот метод позволял эффективно очистить суспензию от бактериальных клеток, при этом критически не изменялась активность бактериофага *P. syringae* 7ф-УлГАУ при его культивировании на различных индикаторных бактериальных культурах. Снижение литической активности на 2-3 порядка было зафиксировано при использовании мембранных фильтров с диаметром пор равным 0,1 мкм.



Таблица 3. Спектр литического действия выделенных бактериофагов

Название бактериофага	Штаммы бактерий <i>P. syringae</i>														Совокупный процент лизиса
	Pss1	Pss2	Pss3	Pss4	Pss5	Pss6	Pss7	Pss8	Pss9	Pss10	Pss11	Pss12	Ps.s.-3-УГСА	B-10917	
1ф-УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	85,7
2ф-УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	92,8
3ф-УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	78,6
4ф-УлГАУ	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	71,4
5ф-УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	85,7
6ф-УлГАУ	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	71,4
7ф-УлГАУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100

Примечание: «+» – лизис культуры бактерий, «-» – отсутствие лизиса

Таблица 4. Специфичность бактериофагов *P. syringae*

Тестируемая бактериальная культура	Название бактериофага						
	1ф-УлГАУ	2ф-УлГАУ	3ф-УлГАУ	4ф-УлГАУ	5ф-УлГАУ	6ф-УлГАУ	7ф-УлГАУ
<i>Pseudomonas syringae</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Echerichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 5. Изменение литической активности бактериофага *P. syringae* 7ф-УлГАУ ( $10^9$  БОЕ/мл) после инактивации индикаторной бактериальной культуры различными методами, БОЕ/мл

Метод воздействия	Штамм бактерий					
	Pss1	Pss2	Pss3	Pss4	Pss5	Pss6
Обработка трихлорметаном (1/10, 20 мин)	$1,1 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$
Обработка температурой (62 °С, 20 мин)	$1,2 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$
Фильтрация (величина пор 0,1 мкм)	$1,1 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$
Фильтрация (величина пор 0,22 мкм)	$1,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9 \pm 1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9 \pm 1 \times 10^9$
Метод воздействия	Штамм бактерий					
	Pss7	Pss8	Pss9	Pss10	Pss11	Pss12
Обработка трихлорметаном (1/10, 20 мин)	$1,8 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$
Обработка температурой (62 °С, 20 мин)	$1,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$
Фильтрация (величина пор 0,1 мкм)	$1,1 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$
Фильтрация (величина пор 0,22 мкм)	$1,1 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$3,9 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9 \pm 1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9 \pm 1 \times 10^9$

### Обсуждение

Полученные результаты исследований биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas syringae* имеют практическое значение при разработке экологически безопасных высокоэффективных биопрепаратов различной направленности. Фаговые биопрепараты могут активно использоваться в качестве агентов для контроля и борьбы различных патогенных бактерий, в том числе ассоциированных с растениями [20]. По литературным

данным, фаг-опосредованный биоконтроль успешно опробован в мероприятиях, направленных на профилактику бактериозов, полученные результаты показывали эффективность применяемых решений [21, 22]. Отдельного внимания заслуживает борьба с бактериями, вызывающими болезни фруктов и овощей, что связано, в первую очередь, с отсутствием дополнительных технологических манипуляций при хранении, направленных на снижение уровня микробиологической контаминации. В этом



случае применение фаговых биопрепаратов видится перспективным, поскольку позволяет применять их с целью увеличения сроков хранения растительной продукции. Эксперименты показывают, что выделенные коллективом авторов бактериофаги характеризуются относительно высоким уровнем литической активности по отношению к целевому микроорганизму и широким спектром литического действия. Расширение коллекции бактериальных штаммов *Pseudomonas syringae*, выделенных из объектов ветеринарно-санитарного надзора, в перспективе позволит использовать все фаговые изоляты, выделенные и селекционированные коллективом авторов при разработке высокоспецифичных биопрепаратов. Полученные результаты по определению устойчивости бактериофага *P. syringae* 7ф-УлГАУ к воздействию температурного фактора расширяют перечень потенциальных направлений для его использования, так как эмпирически была доказана стабильность показателя литической активности, что может быть использовано при разработке стратегий хранения продукции растениеводства в различных естественных и искусственных климатических условиях.

#### Литература

1. Khezri M., Mohammadi M. Identification and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from various plants and geographical regions // Journal of Plant Protection Research. 2018. Vol. 58. No.4. P. 354-361.
2. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group / C. Guilbaud, C.E. Morris, M. Barakat et al. // FEMS Microbiology Ecology. 2016. No.92(1). P.146.
3. Morris C.E., Monteil C.L., Berge O. The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes // Annu. Rev. Phytopathol. 2013. No.51. P.85-104.
4. Jun S.R. Diversity of *Pseudomonas* genomes, including *Populus*-associated isolates, as revealed by comparative genome analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2015. No.82. P.375-83.
5. Baltrus D.A., McCann H.C., Guttman D.S. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: Challenges in bacterial molecular plant pathology // Mol. Plant. Pathol. 2017. No.18. P.152-168.
6. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* / M.S.H. Hwang, R.L. Morgan, S.F. Sarkar et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. No.71. P.5182-5191.
7. Hirano S.S., Upper C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. No.64. P.624-653
8. Berge O. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex // PLoS One. 2014. P. 9:e105547.
9. Vinatzer B.A., Monteil C.L., Clarke C.R. Harnessing population genomics to understand how bacterial pathogens emerge, adapt to crop hosts, and disseminate // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. No. 52. P.19-43.
10. Schreiber K.J., Desveaux D. AlgW regulates multiple *Pseudomonas syringae* virulence strategies // Mol. Microbiol. 2011. No.80. P.364-377
11. Transcriptional analysis of the global regulatory networks active in *Pseudomonas syringae* during leaf colonization / X. Yu, S.P. Lund, J.W. Greenwald et al. // mBio. 2014. Vol. 5. No. 5. P. e01683-e01714
12. *Pseudomonas syringae* strains naturally lacking the classical *P. syringae* hrp/hrc Locus are common leaf colonizers equipped with an atypical type III secretion system / C.R. Clarke, R. Cai, D.J. Studholme et al. // Mol. Plant. Microbe. Interact. 2010. No. 23. P.198-210.
13. Xin X.F., He S.Y. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants // Annu. Rev. Phytopathol. 2013. No. 51. P.473-498.
14. Mazzaglia A. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage // PLoS One. 2012. P. 7:e36518
15. Phages in nature / M.R. Clokie, A.D. Millard, A.V. Letarov et al. // Bacteriophage 2011. Vol. 1. No.1. P. 31-45.
16. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. Jones, G. Vallad, F.B. Iriarte et al. // Bacteriophage. 2012. No. 2. P.208-214.
17. Каттер Э., Сулакведзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение. М.: Научный мир, 2012. 636 с.

#### Заключение

Проведенные исследования позволили определить биологические свойства семи бактериофагов, активных в отношении бактерий *Pseudomonas syringae*. Выделенные и селекционированные коллективом авторов бактериофаги формировали округлые колонии различного размера. Зафиксированы показатели литической активности в диапазоне  $10^6$ - $10^9$  БОЕ/мл. В процессе хранения в течение 6 месяцев при температуре  $3 \pm 1$  °C наблюдалось снижение литической активности большинства фаговых изолятов на один порядок, исключением являлись штаммы 3ф-УлГАУ и 7ф-УлГАУ. Кроме того, у бактериофага 7ф-УлГАУ установлен максимальный показатель спектра литического действия. Установлена видовая специфичность фаговых изолятов. Бактериофаг 7ф-УлГАУ рекомендуется как производственный перспективный компонент для разработки биопрепарата. Экспериментально подобран эффективный способ для очистки фаговой фракции от бактериальных клеток с применением мембранных фильтров.



18. Майоров П. С., Феоктистова Н. А., Васильев Д. А. Разработка схемы выделения бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики (серия Естественные и технические науки). 2019. №. 6 С.20-25.
19. Конструирование бактериофагового препарата для биоконтроля *Pseudomonas syringae* в растениеводстве / Васильев Д.А., Беккалиева А.К., Феоктистова Н.А. и др. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2020. №. 2 (50). С. 130-137.
20. Current State of Compassionate Phage Therapy / S. McCallin, J.C. Sacher, J. Zheng et al. // *Viruses*. 2019. Vol.11. (4). P.343
21. Garvey M. Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety // *Antibiotics*. 2022. Vol.11. No.10. P. 1324.
22. Prospects of bacteriophage collections in disinfectant applications / S.S. Issabekov, N.S. Syrym, A.A. Sambetbayev et al. // *Veterinary World*. 2022. Vol.15. No.1. P. 220.

#### References

1. Khezri M., Mohammadi M. Identification and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from various plants and geographical regions // *Journal of Plant Protection Research*. 2018. Vol. 58. No. 4. P. 354-361.
2. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group / C. Guilbaud, C.E. Morris, M. Barakat, et al. // *FEMS Microbiology Ecology*. 2016. No.92(1). fiv146.
3. Morris C.E., Monteil C.L., Berge O. The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013. No.51. P.85–104.
4. Jun S.R. Diversity of *Pseudomonas* genomes, including *Populus*-associated isolates, as revealed by comparative genome analysis // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. No. 82. P.375–83.
5. Baltrus D. A., McCann H. C., Guttman D. S. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: Challenges in bacterial molecular plant pathology // *Mol. Plant. Pathol.* 2017. No.18. P.152–168.
6. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae* / M.S.H. Hwang, R.L. Morgan, S.F. Sarkar, et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. No.71. P.5182–5191.
7. HiraNo S.S., Upper C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. No.64. P.624–653
8. Berge O. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex // *PLoS One*. 2014. P. 9:e105547.
9. Vinatzer B.A., Monteil C.L., Clarke C.R. Harnessing population genomics to understand how bacterial pathogens emerge, adapt to crop hosts, and disseminate // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2014. No. 52. P.19–43.
10. Schreiber K.J., Desveaux D. AlgW regulates multiple *Pseudomonas syringae* virulence strategies // *Mol. Microbiol.* 2011. No. 80. P.364–377
11. Transcriptional analysis of the global regulatory networks active in *Pseudomonas syringae* during leaf colonization / X. Yu, S.P. Lund, J.W. Greenwald et al. // *mBio*. 2014. Vol. 5. No. 5. P. e01683–e01714
12. *Pseudomonas syringae* strains naturally lacking the classical *P. syringae* hrp/hrc Locus are common leaf colonizers equipped with an atypical type III secretion system / C.R. Clarke, R. Cai, D.J. Studholme, et al. // *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2010. No. 23. P.198–210.
13. Xin X.F., He S.Y. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013. No. 51. P.473–498.
14. Mazzaglia A. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage // *PLoS One*. 2012. P. 7:e36518
15. Phages in nature / M.R. Clokie, A.D. Millard, A.V. Letarov et al. // *Bacteriophage* 2011. Vol. 1. No.1. P. 31–45.
16. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. Jones, G. Vallad, F.B. Iriarte et al. // *Bacteriophage*. 2012. No. 2. P.208-214.
17. Katter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages: biology and practical application. M.: Scientific world, 2012. 636 p.
18. Maiorov P.S., Feoktistova N.A., Vasiliev D.A. Development of a bacteriophage isolation scheme of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // *Modern Science: Actual problems of theory and Practice (Natural and Technical Sciences series)*. 2019. No. 6. P.20-25.
19. Bacteriophage preparation development for biocontrol of *Pseudomonas syringae* in crop science / D.A. Vasiliev, A.K. Bekkalieva, N.A. Feoktistova et al. // *Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy*. 2020. No. 2 (50). P. 130-137.
20. Current State of Compassionate Phage Therapy / S. McCallin, J.C. Sacher, J. Zheng et al. // *Viruses*. 2019. Vol. 11. (4). P.343
21. Garvey M. Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety // *Antibiotics*. 2022. Vol.11. No.10. P. 1324.
22. Prospects of bacteriophage collections in disinfectant applications / S.S. Issabekov, N.S. Syrym, A.A. Sambetbayev et al. // *Veterinary World*. 2022. Vol.15. No.1. P. 220.