

ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ

Научная статья

УДК 578.23

<https://agroconf.sgau.ru>

**Изучение взаимодействия биологической системы фаг – хозяин:  
бактериофаг Ps.s-7 УлГАУ и *Pseudomonas syringae* P.s. -3**

**Наталья Александровна Феоктистова, Екатерина Владимировна  
Сулдына, Павел Сергеевич Майоров, Ильнур Мынгалиевич  
Абдурахманов**

**Ульяновский государственный аграрный университет имени  
П.А. Столыпина», г. Ульяновск, Россия.  
e-mail: feokna@yandex.ru**

**Аннотация.** В статье представлены результаты исследований по изучению специфичности взаимодействия бактериофага Ps.s-7 УлГАУ с бактериальной клеткой индикаторной культуры *Pseudomonas syringae* P.s. – 3. Экспериментально установлено, что бактериофаг Ps.s-7 УлГАУ имел показатель скорости адсорбции равный  $K = 4,1 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$ ; определен латентный период внутриклеточного развития фага Ps.s-7 УлГАУ на бактериальной клетке *Pseudomonas syringae* P.s. – 3, который составляет 25-26 минут. Средняя урожайность бактериофага Ps.s-7 УлГАУ равна 161,45 вирусных частиц на одну бактериальную клетку *Pseudomonas syringae* P.s. - 3.

**Ключевые слова:** бактериофаг, *Pseudomonas syringae*, бактериальная культура, взаимодействие, система.

**Для цитирования:** Феоктистова Н. А., Феоктистова Е.В., Майоров П.С., Абдурахманов И.М. Изучение взаимодействия биологической системы фаг – хозяин: бактериофаг Ps.s-7 УлГАУ и *Pseudomonas syringae* P.s. -3 // Аграрные конференции. 2021. № 30(6). С. 21-26. <http://agroconf.sgau.ru>

NATURAL SCIENCES

Original article

**Study of interaction of biological system of fag - host: bacteriophage Ps.s-7  
ULGAU and *Pseudomonas syringae* P. -3**

**Natalya A. Feoktistova, Ekaterina V. Suldyina, Pavel S. Mayorov, Ilnur M.  
Abdurakhmanov**

Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russia  
[feokna@yandex.ru](mailto:feokna@yandex.ru).

**Abstract.** The article presents the results of studies on the specificity of the interaction of bacteriophage Ps.s-7 ULGAU with the bacterial cell of the indicator culture *Pseudomonas syringae* P. – 3. It was experimentally established that bacteriophage Ps.s-7 ULGAU had an adsorption rate index of  $K = 4.1 \text{ cm}^3/\text{min}^{-1}$ ; latent period of intracellular development of phage Ps.s-7 ULGAU on bacterial cell *Pseudomonas syringae* P. - 3, which is 25-26 minutes. The average yield of bacteriophage Ps.s-7 ULGAU is 161.45 viral particles per bacterial cell *Pseudomonas syringae* P. - 3.

**Keywords:** bacteriophage, *Pseudomonas syringae*, bacterial culture, interaction, system.

**For citation:** Feoktistova N.A., Suldina E.V., Mayorov P.S., Abdurakhmanov I.M. Study of interaction of biological system of fag - host: bacteriophage Ps.s-7 ULGAU and *Pseudomonas syringae* P. -3. *Agrarnye konferensii = Agrarian Conferences*, 2021;(30(6)): 21-26 (In Russ.). <http://agroconf.sgau.ru>

**Введение.** Особое значение при изучении бактериофагов имеет характеристика специфичности взаимодействия фага с клеткой. В результате данной ферментно-субстратной связи идет узнавание рецепторов клетки-хозяина специфическим бактериофагом [1]. Известно, что фаговая специфичность условно зависит от химического строения рецепторов бактериальной клетки и, собственно, строения самого бактериофага. При этом для одних рецепторов нужна более сложная структура организации отростка фаговой частицы, для других менее сложная [2]. Одна и та же бактериальная клетка может содержать рецепторы для нескольких фагов различных между собой, в свою очередь которые обладают способностью соединяться только с определенными для конкретного фага рецепторами [3].

В последние годы увеличилось количество исследований, посвященных изучению бактериофагов как альтернативы для борьбы с фитопатогенами [4-6]. Но для разработки фаговых биопрепаратов необходимо изучение основных биологических характеристик и особенностей взаимодействия каждой конкретной биологической системы - бактериофаг/ индикаторная бактериальная культура.

Используя метод, основанный на определении количества бляшкообразующих единиц неадсорбированного бактериофага в консорциуме бактерия-бактериофаг, нами была поставлена цель изучить адсорбцию выделенного и селекционированного бактериофага Ps.s-7 УлГАУ при взаимодействии их индикаторной бактериальной культурой *Pseudomonas syringae* P.s. - 3.

**Методика исследований.** Экспоненциально растущие бактериальные клетки смешивали с бактериофагом (множественность инфицирования (МОИ) = 0,001) и инкубировали при комнатной температуре. Образцы (100 мкл) отбирали через 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 мин, смешивали с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа. После центрифугирования надосадочную жидкость титровали для определения неадсорбированных или обратимо

адсорбированных фагов через разные временные интервалы. Количественно адсорбцию выражали константой скорости адсорбции  $k$ , измеряемой в мл/мин:

$$K = 2,3/(Bt) \cdot \log(P_0/P), \quad (1)$$

где  $B$  – титр бактерий в начальный момент в 1 мл;  $t$  – время, мин;  $P_0$  – титр фага, определенный при времени 0;  $P$  – титр фага, неадсорбированного на поверхности бактериальной клетки за время  $t$ .

Латентный период и выход фаговых частиц определяли следующим образом: 50 мл бактериальных клеток инкубировали до экспоненциальной стадии роста ( $OD_{600} = 0,3$ ), далее 20 мл полученной жидкой бактериальной культуры центрифугировали при 4 °С, 5 мин, 7000 g. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл свежего Luria-Bertani (LB) бульона и смешивали с бактериофагом таким образом, что  $MOI = 0,01$ . Смесь бактериофага и бактериальных клеток инкубировали 5 мин при температуре 37 °С. Неадсорбированные фаги удаляли путем центрифугирования в течение 2 мин при 13000 g. Осадок ресуспендировали в 10 мл предварительно подогретого LB. Образцы отбирали через 5–10-минутные интервалы в течение 2 ч и немедленно титровали. Выход бактериофага определяли как отношение максимального количества высвободившихся фаговых частиц в конце размножения к количеству фаговых частиц во время латентного периода.

**Результаты исследований.** Для консорциума бактерия-бактериофаг (Ps.s-7 УлГАУ на бактериальной клетке индикаторной культуры *Pseudomonas syringae* P.s. - 3) в зависимости от процента максимальной ее адсорбции устанавливали время адсорбции фага (табл. 1).

Таблица 1

Результаты изучения скорости адсорбции бактериофага Ps.s-7 УлГАУ на бактериальной клетке индикаторной культуры *Pseudomonas syringae* P.s. – 3

Название бактериофага и микроорганизма	Время адсорбции максимального количества фага, мин	Количество фага до адсорбции (по показателю негативных колоний) $M \pm m$	Количество неадсорбированного фага (по показателю бляшкообразующих единиц) $M \pm m$	Процент адсорбции
Ps.s-7 УлГАУ / <i>Pseudomonas syringae</i> P.s. - 3	5	200,0 $\pm$ 11,0	104,3 $\pm$ 2,1	48,0
	6		81,1 $\pm$ 9,2	59,45
	Константа скорости адсорбции $K = 4,1 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$			

В результате проведенных исследований было установлено, что бактериофаг Ps.s-7 УлГАУ имел показатель скорости адсорбции равный  $K = 4,1 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$ .

В предварительном опыте параллельного титрования эмбихина на фаге и на соответствующем бактериальном хозяине Ps.s-7 УлГАУ и *Pseudomonas syringae P.s.* – 3 была установлена рабочая доза препарата, которая выражается количеством, способным за 5 минут в 0,9 мл физиологического раствора при  $36\pm 1$  °С инактивировать 90-95 % фага при его исходной концентрации  $n \times 10^9$  частиц в 1 мл.

Опытным путем установлено, что изучаемый бактериофаг в рабочей дозе в аналогичных условиях не должен оказывать антибактериального действия при контакте с  $2,4 \times 10^8$  КОЕ бактерий. В экспериментах определено, что рабочая доза эмбихина была равна 7  $\gamma$ , т.е. среднему из двух последних эффективных доз.

После определения рабочей дозы проводили основной опыт. Бактериальную культуру, выращенную в мясо-пептонном бульоне и находящуюся в логарифмической фазе роста, разводили мясо-петонным бульоном до концентрации бактерий  $2 \times 10^8$  КОЕ бактерий. в 1 мл. К 0,9 мл такой культуры, предварительно адаптированной к  $28\pm 1$  °С, добавляли соответствующего бактериофага 0,1 мл, содержащего  $2,0 \times 10^8$  БОЕ/мл, затем систему фаг/хозяин инкубировали в термостате в течение 5 минут, а затем 0,1 мл переносили в 0,9 мл физиологического раствора с рабочей дозой эмбихина, предварительно прогретого в водяной бане при  $28\pm 1$  °С.

После 5-минутной инкубации смеси при  $28\pm 1$  °С опыт продолжали по методу Эллиса и Дельбрюка [7]. Затем из этой пробирки брали 0,1 см<sup>3</sup> жидкости, которую вносили к 9,9 см<sup>3</sup> бульона. Из четвертой пробирки брали 0,1 см<sup>3</sup> жидкости и вносили в 9,9 см<sup>3</sup> бульона (пятая пробирка). Получая указанные разведения, мы стремились создать постоянную и наименьшую концентрацию частиц фага в четвертой пробирке и свести ее на нет в пятой, с целью возможности подсчета колоний фага по окончании латентного периода. Из 4-й и 5-й пробирок приготовленными разведениями через каждые 1-2 мин брали по 0,1 см<sup>3</sup> жидкости и засекали в две бактериологические чашки по методу агаровых слоев. Подсчет негативных колоний проводили после 16-18-часового инкубирования чашки при  $28\pm 1$  °С.

Основной опыт проводили только после определения рабочей дозы. Результат исследований отражен в табл. 2.

Установлено, что латентный период внутриклеточного развития Ps.s-7 УлГАУ и *Pseudomonas syringae P.s.* – 3 равен 25-26 мин.

На чашках Петри среднее количество бляшкообразующих единиц фага при высевах с 15-й по 25-ю минуту опыта из 4-й пробирки составляет 36,7, а при высевах из пятой пробирки с 40-й по 60-ю минуту равно 59,74. Средняя урожайность бактериофага Ps.s-7 УлГАУ равна  $5974:37=161,45$  вирусных частиц на одну микробную клетку *Pseudomonas syringae P.s.* - 3.

## Изучение латентного периода и урожайности бактериофага Ps.s-7 УлГАУ

Время начала опыта	Число негативных колоний фага при высеве из 4-й пробирки M±m	Число негативных колоний фага при высеве из 5-й пробирки M±m
15	15,3±2,0	
17	37,4±1,7	
20	57,4±2,2	
25	96,2±5,4	
27	144,0±13,4	29,4±1,4
29	Стерильное пятно	31,2±1,3
30	Сливной рост негативных колоний	29,7±2,2
35	Лизис	45,4±1,4
40		49,2±1,6
45		54,3±1,4
50		61,4±1,7
55		69,3±1,4
60		64,5±2,3

**Заключение.** Установлено, что латентный период внутриклеточного развития Ps.s-7 УлГАУ на *Pseudomonas syringae P.s.* – 3 равен 25-26 минут. Средняя урожайность бактериофага Ps.s-7 УлГАУ равна 161,45 вирусных частиц на одну микробную клетку *Pseudomonas syringae P.s.* - 3. В результате проведенных исследований было установлено, что бактериофаг Ps.s-7 УлГАУ имел показатель скорости адсорбции  $K = 4,1 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$ .

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области РФ в рамках научного проекта № 19-44-730014.**

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Летаров А.В. Современные концепции биологии бактериофагов. М., 2019. 384 с.
2. Kutter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages: biology and applications // Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. 510p.
3. Miroshnikov K.A., Kulikov E.E., Darbeeva O.S., Lysko K.A., Ignatiev G.M. Molecular biological and genetic principles of selection of therapeutic bacteriophages of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Staphylococcus* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2014. No. 50 (3). P. 338.
4. Rombouts S., Volckaert A., Venneman S., Declercq B., Vandenhuevel D., Allonsius C.N., Van Malderghem C., Jang H.B., Briers Y., Noben J.P.

Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *Porri* // *Frontiers in Microbiology*. 2016. 7. P. 279.

5. Yin Y., Ni P.E., Deng B., Wang S., Xu W., & Wang D. Isolation and characterization of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* // *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*. 2019. No. 3 (69). P. 199-208.

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

7. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дис. ... д-ра биол. наук. Ульяновск, 2007. 341 с.

### References

1. Letarov A.V. Modern concepts of bacteriophage biology. Moscow, 2019. 384 p.

2. Kutter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages: biology and applications. *Boca Raton*; 2005: 510.

3. Miroshnikov K.A., Kulikov E.E., Darbeeva O.S., Lysko K.A., Ignatiev G.M. Molecular biological and genetic principles of selection of therapeutic bacteriophages of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Staphylococcus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014; 50(3): 338.

4. Rombouts S., Volckaert A., Venneman S., Declercq B., Vandenhoevel D., Allonsius C.N., Van Malderghem C., Jang H.B., Briers Y., Noben J.P. Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *Porri*. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 279.

5. Yin Y., Ni P.E., Deng B., Wang S., Xu W., & Wang D. Isolation and characterization of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*. 2019; 3 (69): 199-208.

6. Xin X. F., Kvitko V., He S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 2018; 5 (16): 316.

7. Zolotukhin S.N. Creation and development of schemes for the use of diagnostic biological products based on isolated and studied bacteriophages of enterobacteria. Ulyanovsk, 2007. 341 p.

*Статья поступила в редакцию 14.10.2021; одобрена после рецензирования 14.11.2021; принята к публикации 30.11.2021.*

*The article was submitted 14.10.2021; approved after reviewing 14.11.2021; accepted for publication 30.11.2021.*