

2  
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Оренбургская область  
Гора Змеиная  
Вельмовский П.В.



2023

**УЧРЕДИТЕЛЬ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Б.Ж. Рыскалиева, И.И. Богданов, 2023

УДК 579

Б.Ж. Рыскалиева<sup>1</sup>, И.И. Богданов<sup>2</sup>

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИИ С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИОФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА

<sup>1</sup> Западно-Казахстанский аграрно-технический университет им. Жангир хана, Уральск, Республика Казахстан

<sup>2</sup> Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

*Цель.* Идентификация бактерий с помощью бактериофагового биопрепарата.

*Материалы и методы.* Произведена идентификация фитопатогенных бактерий с применением бактериофагового биопрепарата

*Результаты.* Идентификация выделенных штаммов как *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* на основе бактериофагов была доказана полученными результатами биохимических свойств бактерий.

*Заключение.* Проведенные исследования фагоиндикации показывают возможность применения схемы идентификации бактерии *P. carotovorum* spp. *carotovorum*, используя бактериофаговый биопрепарат

*Ключевые слова:* мягкая гниль, фитопатогены, *Pectobacterium carotovorum*, идентификация, бактериофаги, фагоиндикация.

---

---

B.Zh. Ryskaliyeva <sup>1</sup>, I.I. Bogdanov<sup>2</sup>

## IDENTIFICATION OF BACTERIA USING BACTERIOPHAGE BIOPREPARATION

<sup>1</sup> West Kazakhstan Agrarian and Technical University named after Zhangir Khan, Uralsk, Republic of Kazakhstan

<sup>2</sup> Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russia

*Aim.* Identification of bacteria using bacteriophage biopreparation.

*Materials and methods.* Identification of phytopathogenic bacteria with the use of bacteriophage biopreparation was carried out.

*Results.* The identification of the isolated strains as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* based on bacteriophages was proved by the results of the biochemical properties of bacteria

*Conclusions.* The conducted phagoindication studies show the possibility of using the identification scheme of the bacterium *P. carotovorum* spp. *carotovorum* using a bacteriophage biopreparation.

*Keywords:* soft rot, phytopathogens, *Pectobacterium carotovorum*, identification, bacteriophages, phagoindication.

## Введение

Бактериальные инфекции – проблема мирового масштаба. Наиболее распространенными возбудителями инфекций среди грамотрицательных бактерий

являются представители семейства *Enterobacteriaceae* [1]. *Pectobacterium* представляют собой грамотрицательные фитопатогенные бактерии, принадлежащие к этому семейству [2]. Они приводят к значительному снижению урожайности, плохому качеству продукции и большим экономическим потерям [3].

Опасность поражения картофеля может возрасти с увеличением потока посадочного материала, произведенного в странах с более сложной, чем в России, фитосанитарной ситуацией. Для сокращения ущерба от поражения, необходимо создание достоверных методов диагностики, которые обладают высокой чувствительностью и специфичностью [4]. Пектолитические фитопатогенные энтеробактерии (*Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp.) являются причиной огромных потерь картофеля [5].

При наличии быстрых, эффективных методов диагностики можно снизить опасную угрозу распространения фитопатогенных бактерий [6].

Бактериальные болезни растений распространяются из-за отсутствия своевременной, достоверной диагностики патогенов. Бактерии *Pectobacterium* (*Erwinia*) наносят огромный вред сельскому хозяйству. Экономические потери составляют 20-80%. На сегодняшний день в развитых странах немаловажное значение придается биологическим методам диагностики, которые опираются на применении вирусов. Очень перспективным считается использование специфических бактериофагов [7].

В природе разные виды бактерий, в том числе патогенные и полезные, существуют в разных средах обитания, включая окружающую среду, растения, животных и людей. Патогенные бактерии должны быть обнаружены на более ранних стадиях инфекции, однако обычные процедуры обнаружения бактерий сложны и требуют много времени. Напротив, современные молекулярно-генетические подходы, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и иммуноферментный анализ (ИФА), значительно сократили время их обнаружения; тем не менее, такие подходы в значительной степени трудоемки и дороги. Поэтому разработка быстрых, недорогих, чувствительных и специфических подходов, доступных любым производственным лабораториям, имеет важное значение. С этой целью новые подходы обнаружения с участием бактериофагов в качестве элементов идентификации привлекают внимание благодаря их высокой степени специфичности, точности и сокращению времени анализа [8].

Обнаружение бактерий в различных природных субстратах обычно включает их выделение на селективных средах с последующей специфической идентификацией на основе морфологических, культурных и биохимических характеристик. В последнее время все чаще используются специфические бактериофаги для идентификации или типирования видов и штаммов бактерий; этот метод доказал свою значимость в медицинской и эпидемиологической практике [9].

Бактериофаги – бактериальные вирусы, которые повсеместно распространены в окружающей среде. С ростом знаний и современных технологий бактериофаги могут использоваться для решения широкого спектра вопросов. Нет сомнений в том, что их применение в биологическом контроле патогенных микроорганизмов определенно пойдет на пользу обществу, поскольку они безвредны для человека и, следовательно, могут внести ценный вклад в безопасность пищевых продуктов [10]. Бактериофаги, являясь естественными компонентами биосферы, могут быть легко изолированы везде, где встречаются бактерии, включая почву, воду, растения, сточные воды, животных и организм человека. Бактериофаги присутствуют практически в любой среде, и происходит их непрерывный прямой контакт людьми. Такая широкая распространенность доказывает, что фаги безопасны для окружающей среды и могут быть эффективно использованы в сельском хозяйстве [11].

Бактериофаги бактерий рода *Pectobacterium*, вызывающих заболевания картофеля (черную ножку и мягкую гниль), – сравнительно малоизученная группа фагов [12].

Диагностика и идентификация патогенов важны во многих отраслях, в том числе, при контроле за состоянием окружающей среды. Вирусным инфекциям, бактериозам, гельминтозам, микозам подвержены все растения. В сельском хозяйстве это грозит большими потерями. При заражении картофеля бактериями рода *Pectobacterium* урожайность снижается в пределах 10-80%, уменьшается содержание крахмала, ухудшается качество продукции, а также её 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 [6].

Фаготипирование – недорогой и относительно быстрый инструмент для дифференциации штаммов в эпидемиологических и микробиологических исследованиях по отслеживанию источников. Хотя фаготипирование все чаще заменяют современными, более сложными молекулярными методами, оно не теряет значение из-за своей простоты, низкой стоимости и специфичности [13].

Цель работы – идентификация бактерий с помощью бактериофагового биопрепарата.

### Материалы и методы

Экспериментальная работа выполнялась в ФГБОУ ВО «Ульяновский ГАУ им. П.А. Столыпина» в 2017-2019 гг. В качестве тестовых компонентов идентификации были использованы данные, представленные в справочнике «Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) (Whitman, W. B., 2015) [14]. Изучение биологических свойств проводилось классическими методиками [15]. Выделение бактериофагов проводилось методами, предложенными С.Н. Золотухиным (2007) [16], Э. Каттер (2012) [17], Д.А. Викторовым (2014) [18].

### Результаты и обсуждение

Нами разработана схема ускоренной видовой идентификации бактерий *Pectobacterium carotovorum*, используя строгую специфичность селекционированных фагов (рис. 1).

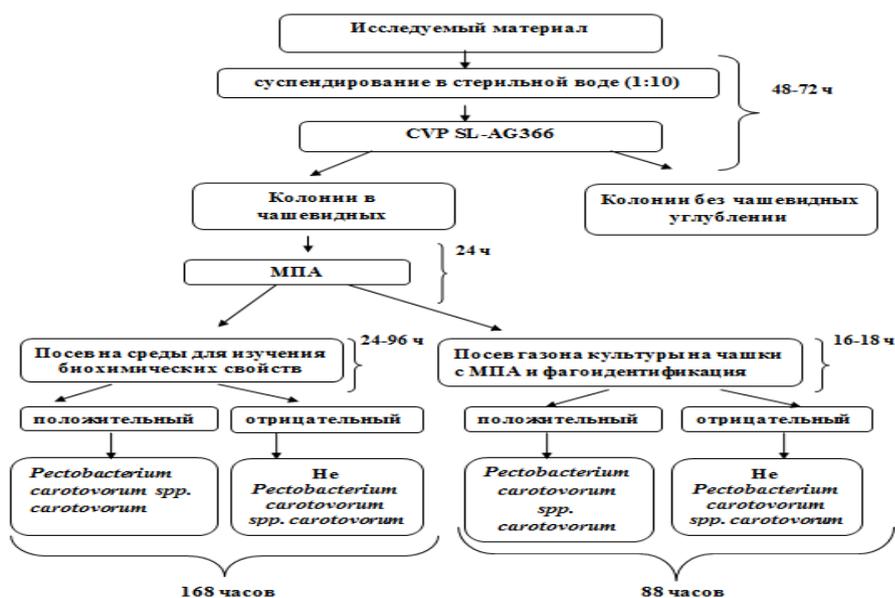


Рис. 1. Выделение бактерий *P. carotovorum* spp. *carotovorum* и ускоренная идентификация с помощью бактериофагов в сравнении с традиционной схемой бактериологического исследования.

Подготовку, посев материала и изучение биологических свойств бактерий проводили по классическим методикам. В исследование брали пробы почвы, картофеля и воды, контаминированные фитопатогенными бактериями *P. carotovorum* в концентрации  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  м.к. в 1 мл. Выросшие в чашках на пектатной среде SL-CVP AG366 и образующие, погруженные серовато-светло-сиреневые колонии в чашевидных углублениях пересеивали в мясо-пептонный бульон и мясопептонный агар. Инкубировали при температуре 28°C. Идентифицировали бактериологическим методом и использовали бактериофаговый биопрепарат.

Идентификация выделенных штаммов бактериологическим методом включала тесты схемы выделения и бактериологической идентификации. Результаты изучения биохимических свойств отражены в таблице 1.

Таблица 1. Бактериологический метод идентификации выделенных бактерий

Объект	Обозначение штамма	Тесты	Бактерия
Сточные воды	1в	Среда CVP SL-AG366, Тест на патогенность; Среда Кинг В (пигмент); Картофельный агар с 2,3,5-ТТХ; Картофельный агар с генциан-виолетом; Окраска по Граму; Орнитиндекарбоксилаза, индол и подвижности (в одной пробирке); О/Ф тест; Рост при 40°C; Каталаза; Оксидаза; Лецитиназа; Чувствительность к эритромицину; Лактоза; Раффиноза; Трегалоза; Сахароза; Рамноза; Желатиназа; Рост при 5% NaCl; Рост при 37°C; Цитрат Симонса; Казеиназа; Сорбит; Мальтоза; MR-тест	<i>P.c. spp. carotovorum</i>
	2в		<i>Pseudomonas</i>
Картофель с признаками мягкой гнили	1к		<i>P. chrysanthemi</i>
	2к		<i>P. atrosepticum</i>
	3к		<i>P.c. spp. carotovorum</i>
	4к		<i>Pseudomonas</i>
	5к		<i>P.c. spp. carotovorum</i>
Почва	6к		<i>P.c. spp. carotovorum</i>
	1п		<i>Pseudomonas</i>
	2п		<i>P.c. spp. carotovorum</i>
	3п		<i>P. atrosepticum</i>
	4п		<i>Pseudomonas</i>

**Фагоидентификация.** На чашки с мясо-пептонным агаром наносили суточную культуру бактерий, распределяли по поверхности и подсушивали 20 мин. Затем чашку делили на сектора и стерильной пипеткой наносили капли бактериофагового биопрепарата; на третий сектор (контроль) наносили стерильный мясо-пептонный бульон и наклоняли таким образом, чтобы капли стекали вниз. После подсушивания стекающих капель чашки инкубировали 16-18 часов при температуре 28 °С.

Зона лизиса показывает принадлежность исследуемого штамма к *P. carotovorum spp. carotovorum*. Отсутствие лизиса считали отрицательным ре-

зультатом (табл. 2)

Таблица 2. Фагоидентификация выделенных штаммов

Объект	Обозначение штамма	Фагоидентификация		Результаты идентификации по биохимическим свойствам
		Бактериофаговый биопрепарат	Результат	
Сточные воды	1в	+	<i>P.c. spp. carotovorum</i>	<i>P.c. spp. carotovorum</i>
	2в	-	-	<i>Pseudomonas</i>
Картофель с признаками мягкой гнили	31к	-	-	<i>P. chrysanthemi</i>
	2к	-	-	<i>P. atrosepticum</i>
	3к	+	<i>P.c. spp. carotovorum</i>	<i>P.c. spp. carotovorum</i>
	4к	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	5к	+	<i>P.c. spp. carotovorum</i>	<i>P.c. spp. carotovorum</i>
	6к	+	<i>P.c. spp. carotovorum</i>	<i>P.c. spp. carotovorum</i>
Почва	1п	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	2п	+	<i>P.c. spp. carotovorum</i>	<i>P.c. spp. carotovorum</i>
	3п	-	-	<i>P. atrosepticum</i>
	4п	-	-	<i>Pseudomonas</i>
Затраченное время на исследование, суток			4	7

Идентификация выделенных штаммов как *P. carotovorum spp. carotovorum* были доказаны полученными результатами биохимических свойств бактерий.

### Заключение

Проведенные исследования фагоиндикации доказывают возможность применения схемы идентификации бактерии *P. carotovorum spp. carotovorum* с использованием бактериофагового биопрепарата. Фагоидентификация дает возможность сократить время, затрачиваемое на исследования в несколько раз, уменьшая расход лабораторной посуды и реактивов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский В.И. и др. Инфекционные болезни и эпидемиология. М.: ГЭОТАР-медиа, 2007. 883 с.
2. Mansfield J. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2012. 13(6): 614-629.
3. Muturi P. Bacteriophages Isolated in China for the Control of *Pectobacterium carotovorum* Causing Potato Soft Rot in Kenya. *Virologica Sinica*. 2019. 34(3): 287-294.
4. Карлов А.Н. Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola*.

- Известия ТСХА. 2011. 3: 38-48.
5. Мирошников К.А. Оценка генетического разнообразия бактериальных патогенов картофеля. Высокопроизводительное секвенирование в геномике. Спецвыпуск. 2017. 1: 47.
  6. Рязанцев Д.Ю. Диагностика карантинных фитопатогенов методом пцр в формате flash. Сельскохозяйственная биология. 2009. 3: 14-117.
  7. Davitashvili M. D. Extraction and Study of Bacteriophages, Used against Agents of Potato Soft Rot. European Researcher. Series A. 2012. 12-1: 2075-2078.
  8. Farooq U. Bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors. Biosensors and Bioelectronics. 2018. 118: 204-216.
  9. Katznelson H., Sutton M. D. A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infections of seed. [Электр. ресурс] (URL: <https://jb.asm.org/content/jb/61/6/689.full.pdf>. (дата обращения: 20.07.2019))
  10. Tiwari R. Wonder World of Phages: Potential Biocontrol Agents Safeguarding Biosphere and Health of Animals and Humans - Current Scenario and Perspectives. [Электр. ресурс] Pakistan Journal of Biological Science. 2014. 17(3): 316-328.
  11. Hassan E. O. Effect of different bacteriophage isolates on managing potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum* / E. O. Hassan // International Journal of Scientific & Engineering Research. 2017. 8: 719-730
  12. Воронина М.В. Характеристика бактериофага *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* pp16, перспективного для биоконтроля мягкой гнили картофеля. Микробиология. 2019. 4: 458-469.
  13. Hagens S. Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. Microbiology, 2014. 5: 159.
  14. Whitman W. B. (Ed.). Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria (Vol. 410). Hoboken, NJ: Wiley, 2015 doi: 10.1002/9781118960608.fbm00021
  15. Лабинская А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 2004. 576 с.
  16. Золотухин С.Н. Результаты исследований бактериофагов бактерий семейства Enterobacteriaceae. Материалы III Санкт-Петербургского международного экологического форума. Санкт-Петербург: Специальный выпуск, 2014. 81-82.
  17. Катгер Э. Бактериофаги: биологическое и практическое применение. Изд-во «Научный мир», 2012. 638 с
  18. Викторов Д.А. Фагоиндикация *Aeromonas hydrophila*. Материалы III Санкт-Петербургского международного экологического форума. Санкт-Петербург: Специальный выпуск, 2014

Поступила 26 июня 2023 г.

(Контактная информация: **Рыскалиева Балдай Жанайдаровна** – преподаватель ЗКАТУ им. Жангир хана; адрес: 460014, Республика Казахстан, г. Уральск, ул. Жангир хана, 51; тел. 8(775)7942274; e-mail: [bryskalieva@mail.ru](mailto:bryskalieva@mail.ru))

---

---

## REFERENCES

1. Pokrovsky V.I. et al. Infectious diseases and epidemiology. Moscow: GEOTAR-media, 2007. 883 p.
2. Mansfield J. Top 10 phytopathogenic bacteria in the molecular pathology of plants. Molecular pathology of plants. 2012. 13(6): 614-629.
3. Muturi P. Bacteriophages Isolated in China for the Control of *Pectobacterium carotovorum*

- Causing Potato Soft Rot in Kenya. *Virologica Sinica*. 2019. 34(3): 287-294.
4. Karlov A.N. Diagnostics of the bacterial pathogen of potato *Dickeya dianthicola*. *Izvestiya TSKHA*, 2011. 3: 38-48.
  5. Miroshnikov K.A. Evaluation of the genetic diversity of bacterial pathogens of potatoes. High-performance sequencing in genomics. Special Issue. 2017. 1: 47.
  6. Ryazantsev D.Yu. Diagnostics of quarantine phytopathogens by the method of per in flash memory. *Agricultural Biology*. 2009. 3: 14-117.
  7. Davitashvili M. D. Isolation and study of bacteriophages used against pathogens of soft rot of potatoes. *European researcher. Series A*, 2012. 12-1: 2075-2078.
  8. Faruk U. Bacterial biosensing: Recent advances in bioanalysis and biosensors based on phages. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018. 118:204-216.
  9. Katznelson H., Sutton M. D. A rapid page plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infections of seed. [Electr. resource] (URL: <https://jb.asm.org/content/jb/61/6/689.full.pdf>. (accessed: 20.07.2019)
  10. Tiwari R. Wonder World of Phages: Potential Biocontrol Agents Safeguarding Biosphere and Health of Animals and Humans - Current Scenario and Perspectives. [Электр. ресурс] *Pakistan Journal of Biological Science*. 2014. 17(3): 316-328.
  11. Hassan E. O. Effect of different bacteriophage isolates on managing potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum* / E. O. Hassan // *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2017. 8: 719-730.
  12. Voronina M.V. Characteristics of the bacteriophage *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* pp16, promising for biocontrol of soft rot of potatoes. *Microbiology*. 2019. 4: 458-469.
  13. Hagens S. Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Microbiology*. 2014. 5: 159.
  14. Whitman W. B. (Ed.). *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria* (Vol. 410). Hoboken, NJ: Wiley, 2015 doi: 10.1002/9781118960608.fbm00021
  15. Labinskaya A.S. *General and sanitary microbiology with the technique of microbiological research*. M.: Medicine, 2004. 576 p.
  16. Zolotukhin S.N. Results of studies of bacteriophages of bacteria of the Enterobacteriaceae family. *Materials of the III St. Petersburg International Environmental Forum*. Saint Petersburg: Special Issue, 2014. 81-82.
  17. Cutter E. *Bacteriophages: biological and practical application*. Publishing house "Scientific World", 2012. 638 p.
  18. Viktorov D.A. Phagoindication of *Aeromonas hydrophila*. *Materials of the III St. Petersburg International Environmental Forum*. St. Petersburg: Special Issue, 2014.

**Образец ссылки на статью:**

Рыскалиева Б.Ж., Богданов И.И. Идентификация бактерий с помощью бактериофагового биопрепарата. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 2. 8 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-2/Articles/BZR-2023-2.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2023-12008