

*На правах рукописи*



МАЙОРОВ ПАВЕЛ СЕРГЕЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА ФАГОВОГО ПРЕПАРАТА БАКТЕРИЙ *XANTHOMONAS*  
*SAMPESTRIS* И ОБЛАСТЬ ЕГО ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» (ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ)

**Научный руководитель**

**Васильев Дмитрий Аркадьевич**

доктор биологических наук, профессор кафедры «микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

**Официальные оппоненты:**

**Игнатов Александр Николаевич**

доктор биологических наук, заместитель Генерального директора по научной работе ООО "Исследовательский Центр "ФитоИнженерия"

**Куликов Евгений Евгеньевич**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заместитель заведующего лабораторией вирусов микроорганизмов Института микробиологии РАН им. С.Н. Виноградского

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова (ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ)

Защита состоится «16» февраля 2021 года в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ имени Д.И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале (ауд.443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss.muctr.ru>

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_»

2020 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
Д 999.095.03, к.т.н.



И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Бактериальные болезни растений являются важной причиной потери урожая в сельском хозяйстве, поскольку в настоящее время нет эффективных средств борьбы с ними. Сосудистый бактериоз крестоцветных, вызываемый бактериями *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, поражает практически все известные растения, относящиеся к семейству Крестоцветные. В частности, это относится к роду Капустные (*Brassicaceae*). Стандартные методы борьбы с данным заболеванием, к которым относят использование семенного материала хорошего качества, севооборот, выращивание менее восприимчивых к болезни сортов, не способны обеспечить полную защиту растений от бактериальных заболеваний, особенно когда погодные условия благоприятствуют распространению возбудителя.

Индикация и идентификация бактерий *Xanthomonas campestris* также является актуальной проблемой, которой посвящены работы авторов Trindade, Grimault, Koenraadt, Çavuşoğlu, Corzo.

В настоящее время применение бактериофагов для идентификации и борьбы с возбудителями бактериальных болезней растений является быстро расширяющимся направлением в области применения современных методов контроля и профилактики заболеваний культурных растений. В связи с чем бактериофаги могут быть использованы в качестве эффективных антибактериальных мер.

Использование фагоиндикации и фагоидентификации является одной из привлекательных альтернатив существующим методам. Бактериофаги представляют собой вирусы, которые специфически заражают бактерии, их репликация приводит к лизису их бактериального хозяина и высвобождению вновь образованных фаговых частиц. Фаготерапия еще не была исследована для бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, однако имеются обширные данные по использованию данных методов для других бактерий.

Применение фаговых биопрепаратов в различных методиках (в том числе реакция нарастания титра фага) позволяет осуществлять контроль и анализировать количественный и качественный состав выделяемых бактерий, что в отличие от классических бактериологических методов занимает значительно меньше времени. Фагодиагностика как один из методов индикации и идентификации позволяет быстро и точно определить принадлежность исследуемой бактерии не только к определенному роду, но и к виду и даже фаговару.

При этом немаловажным является правильный выбор бактериофагов, входящих в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, что требует тщательного изучения бактериальных штаммов с целью минимизации развития их резистентности к используемым бактериофагам.

Поскольку современные меры идентификации бактериальных патогенов в сельском хозяйстве ограничены и часто оказываются неэффективными, исследователи указывают на потенциал применения фаговых биопрепаратов в рамках комплексной стратегии борьбы с фитопатогенами в данной области. Низкая стоимость производства и относительная простота подготовки фаговых препаратов делают их хорошими кандидатами для широкого использования.

### **Степень разработанности темы.**

В доступных литературных источниках приводятся результаты малочисленных исследований, посвященных бактериофагам *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и созданию на их основе биопрепарата. В России данной темой занимались Во Тхи

Нгок Ха, Джалилов Ф.С., Игнатов А.Н., Орынбаев А.Т. Среди зарубежных авторов работой по изучению бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* занимались S. Widadi, Renu, M. D. Sutton. Более системные исследования проводились в области молекулярной генетики и геномики бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Информации о разработке биопрепарата на основе бактериофагов для индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*, а значит и для диагностики болезни растений не приводится.

**Цель исследования** – разработка биотехнологических параметров изготовления биопрепарата на основе выделенных и изученных бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* и определение области его практического применения.

**Задачи исследования:**

1. Разработать схему выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* из объектов окружающей среды;

2. Выделить и селекционировать бактериофаги, специфичные в отношении бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*;

3. Изучить основные биологические свойства выделенных бактериофагов (морфологию, литическую активность, спектр литического действия, специфичность);

4. Разработать технологические параметры изготовления и контроля биопрепарата, состоящего из бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris*;

5. Разработать схему ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* в объектах внешней среды с применением созданного биопрепарата на основе реакции нарастания титра фага.

6. Разработать экспресс-метод идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* с применением фагового биопрепарата.

**Научная новизна.** Заключается в выделении из образцов почвы и растений, с признаками бактериального заболевания бактериофагов, специфичных в отношении бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Изучены их основные биологические свойства, на основе которых отобран для конструирования биопрепарата бактериофаг Кл34-УлГАУ, имеющий высокие показатели литической активности и специфичности, а также наиболее широкий спектр литического действия.

Впервые разработаны биотехнологические параметры изготовления и контроля биопрепарата бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* целью индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* в образцах почвы и растений.

Установлена возможность применения схемы индикации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* с применением фагового биопрепарата в образцах почвы, растений, воды и посевного материала.

Предложен экспресс-метод выделения и идентификации бактерий вида *Xanthomonas campestris pv. campestris* в образцах внешней среды с помощью созданного фагового биопрепарата.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Применение разработанной схемы индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* с использованием фагового биопрепарата открывает перспективы ее применения в лабораторной практике для оценки контаминирования образцов

почвы, воды, растений и семенного материала бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

На основе материалов проведенных диссертационных исследований разработана нормативно-техническая документация, включающая методические рекомендации «По особенностям культивирования, хранения, очистки и концентрации бактериофагов, активных в отношении бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*», «По ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* методом реакции нарастания титра фага в объектах санитарного надзора», «По выделению и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* из растительного материала и объектов внешней среды с применением специфического бактериофага Кл34-УлГАУ» и «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторного фага Кл34-УЛГАУ бактерий *Xanthomonas. campestris pv. campestris*».

Материалы диссертационной работы используются предприятиями агропромышленного комплекса Ульяновской области, занимающимися выращиванием Капустных, диагностическими лабораториями, а также в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина.

**Методология и методы исследования.** Методологическую основу работы составили анализ литературы по проблеме и традиционные общепринятые методики исследований (эксперимент). В работе использовали методы: микробиологические, биотехнологические, с последующей компьютерной статистической обработкой и научным анализом полученных данных.

**Положения, выносимые на защиту:**

Выделено и идентифицировано 13 штаммов *Xanthomonas campestris pv. campestris* при исследовании 54 образцов почвы, полученных с полей и фермерских хозяйств и 91 образца капусты с признаками поражения бактериозом.

Выделено и селекционировано 10 изолятов бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Все выделенные бактериофаги являются активными по отношению к бактериям *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Сконструирован биопрепарат на основе бактериофага Кл34-УлГАУ, индикаторный штамм - *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2. Данный бактериофаг имеет высокий титр литической активности ( $2,6 \times 10^8$  БОЕ/мл) и максимально широкий, из изученных бактериофагов, спектр литического действия – 96,9%.

Разработана технология изготовления фагового биопрепарата *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Создана схема ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* в объектах окружающей среды методом реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата на основе бактериофагов Кл34-УлГАУ, которая позволяет обнаружить бактерии в объектах окружающей среды при концентрации  $10^4$  м.к./мл в течение 49 часов.

Разработан экспресс-метод выделения и идентификации с использованием разработанного фагового биопрепарата.

**Работа выполнена** на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина.

**Личный вклад автора.** В диссертации представлены результаты исследований, выполненных непосредственно автором. Личный вклад состоит в определении концепции работы, разработке методологии исследований, сборе и подготовке материалов, проведение экспериментов и фиксации результатов, в обработке, анализе, обобщении полученных результатов и формулировании выводов.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов обусловлена значительным объемом экспериментального материала, полученного за счет правильного подбора и применения методик исследований.

Материалы диссертации были представлены на: Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2016); Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Инновационные технологии и технологические средства для АПК» (Воронеж, 2016); Международном конкурсе инновационных проектов молодых ученых «UL-INNOVO» 2017 (Ульяновск, 2017); Международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии» (Саратов, 2017); VI Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и производства» (Кемерово, 2017); Международном научном форуме молодых ученых «Молодежь и наука XXI века» (Ульяновск, 2018).

**Публикации.** По теме диссертации опубликована 8 работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 1 статья, опубликованная в индексируемом журнале Web of Science.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 155 страницах текста, содержит 33 рисунка и 32 таблицы. Диссертация состоит из введения; обзора литературы; собственных исследований, включающих материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и исследование с помощью РНФ образцов растений и почвы; заключения; выводов; практических предложений; перечня сокращений и условных обозначений; списка литературных источников (180 наименований, в том числе 139 зарубежных авторов) и приложений.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Объекты, материалы и методы исследований**

**Штаммы бактерий.** В качестве объектов исследования использовали 5 референс-штаммов *X. campestris pv. campestris*, а также 13 штаммов, выделенных из образцов почвы и капусты с признаками поражения от бактериозов с полей г. Ульяновска и Ульяновской области. Для изучения специфичности выделенных бактериофагов использовались референс-штаммы бактерий *Xanthomonas euvesicatoria* В-627, *Pseudomonas syringae* В-10917, *Xanthomonas arboricola* В-628, *Pectobacterium carotovorum* 1-УлГАУ, *Xanthomonas oryzae* NAI8, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Все штаммы обладают типичными биологическими свойствами.

**Штаммы бактериофагов.** 10 изолятов бактериофагов *X. campestris pv. campestris*, выделенных из образцов почвы и капусты с признаками поражения от бактериозов с полей г. Ульяновска и Ульяновской области.

**Объекты исследований.** В качестве объектов исследования использовались 54 образца почвы, полученных с полей и фермерских хозяйств, занимающихся выращиванием сельскохозяйственных культур семейства Капустные и 91 образец капусты с признаками поражения бактериозом.

**Приборы и оборудование.** Лабораторная бактериологическая посуда, холодильники минусовые и бытовые, термостат ТС 1/80 СПУ, микроскоп «Биомед» с видеофотонасадкой, набор для фильтрации фагов (Millipore-Millivac), водяная баня, лабораторные центрифуги СМ – 6 М с угловыми и баккет-роторами, автоклав ГК-100-3, термометр ртутный, дистиллятор, лупа бинокулярная МБС – 9, шкаф сушильно-стерилизационный ШСС – 80.

**Методы.** Выделение, индикация и идентификация бактерий была проведена по общепринятым бактериологическим методам. Культуральные, биохимические и морфологические свойства бактерий *X. campestris pv. campestris* определяли в соответствии с литературными данными.

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам С.Н. Золотухина, Э. Каттер. Литическую активность определяли по методам Грациа и Аппельману. Реакцию нарастания титра фага для индикации *X. campestris pv. campestris* в объектах внешней среды проводили по методам В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба. Конструирование биопрепарата проводили по методу С.Н. Золотухина.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием программных обеспечения Microsoft Office 2017.

### **Результаты собственных исследований**

#### **Разработка схемы выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* из объектов окружающей среды**

В период с 2016 по 2019 год было исследовано на наличие бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* 54 образца почвы, полученных с полей и фермерских хозяйств г. Ульяновска и Ульяновской области и 91 образец капусты с признаками поражения бактериозом. Выделение бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* проводили по методикам, опробованным на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ (Васильев, 2019), идентификацию микроорганизмов проводили на основе тестов, представленных в литературных источниках.

Установлено, что изученные культуры представляли собой прямые палочковидные грамотрицательные бактерии с закругленными краями, одиночные либо соединенные в цепочки. Изученные культуры являлись подвижными микроорганизмами и обладали амилалитической активностью. Каталазоположительные, оксидазоотрицательные.

На основе полученных данных по референс-штаммам была разработана бактериологическая схема выделения и ускоренной идентификации бактерий *X. campestris pv. campestris*, включающая морфологические и биохимические признаки.

I. На первом этапе осуществляется пробоподготовка - готовится суспензия, для чего навеску из исследуемого материала добавляют в физиологический раствор в соотношении 1/10. Для получения одиночных колоний бактерий предлагается проводить пятикратное разведение полученной суспензии в пропорции 1/10. После

чего производится посев бактерий на плотную питательную среду YDC. Результат I этапа - наличие однородных колоний бактерий с желтым пигментом.

II. На втором этапе полученные колонии, соответствующие бактериям *X. campestris* pv. *campestris*, пересеваются на жидкую питательную среду LB, проводится окраска выделенных культур по Граму, изучение подвижности и амилолитической активности. Проводится изучение ферментативной активности. Результат II этапа – выделение грамотрицательных бактерий, подвижных и проявляющих амилолитическую активность, каталазоположительность, оксидазоотрицательность.

III. На третьем этапе идет изучение таких биохимических показателей искомым бактерий, как образование индола, продукция ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра), интенсивность кислотообразования (реакция с метил-рот) и разжижение желатина. Результаты по указанным тестам получают после 48 часов культивирования данных бактерий при 28°C. Параллельно с 3 этапом производится постановка тестов на образование H<sub>2</sub>S и ферментацию глюкозы, сахарозы, лактозы и сорбита. Учет результатов осуществляли каждые 24 часа в течении 120 часов. Результат III этапа – отсутствие образования бактериями индола, продукции ацетоина и отрицательная реакция с метил-рот, разжижение желатина, положительные показатели бактерий по выделению сероводорода, ферментации глюкозы и сахарозы, отсутствие ферментации лактозы и сорбита.

На основе представленной схемы выделения и идентификации бактерий *X. campestris* pv. *campestris* были проведены исследования по выделению бактерий *X. campestris* из пораженных частей капусты и образцов почвы. В период с 2018 по 2019 год было происследовано на наличие бактерий *X. campestris* pv. *campestris* 91 образец капусты с признаками поражения бактериозом и 54 образца почвы.

На данном этапе исследований было выделены 6 «полевых» штаммов бактерий вида *X. campestris* pv. *campestris*. Все выделенные штаммы обладали типичными свойствами.

#### **Выделение и селекция бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Проведены исследования по выделению бактериофагов из культур бактерий путем воздействия на них индуцирующим фактором, в качестве которого применялись ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), источником которых служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90 % излучаемой энергии в виде УФ-лучей с длиной волны 254 нм. В эксперименте использовали культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста. В дальнейшем исследования проводилось выделение профага из бактериальных клеток воздействием на них химическим фактором, индуцирующим механизм репликации фаговой ДНК, в качестве которого использовался митомицин С в дозе 0,5 мкг/мл. По результатам проведенных исследований нам не удалось выделить бактериофаги бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Нами не был обнаружен переход профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий, в связи с чем второй этап наших исследований был направлен на выделение бактериофагов из объектов внешней среды по методике Д.М. Гольдфарба в модификации И.П. Ревенко.

В качестве наилучшего способа инактивации бактерий в фильтрате использовали обработку хлороформом при концентрации вещества в культуре бактерий 1/10 и времени экспозиции 20 мин. Далее полученные субстраты исследовали на наличие в них бактериофагов методом Отто.

Всего по итогам проведенных исследований из 41 пробы почвы и 74 проб растений было выделено 10 бактериофагов. Результаты проведенных опытов представлены на рисунке 2.

На основе результатов проведенных исследований была разработана схема выделения бактериофагов *X. campestris pv. campestris*. В качестве основных критериев при разработке данной схемы выступали:

- время получения результатов;
- наибольшая степень лизиса бактериальных клеток.

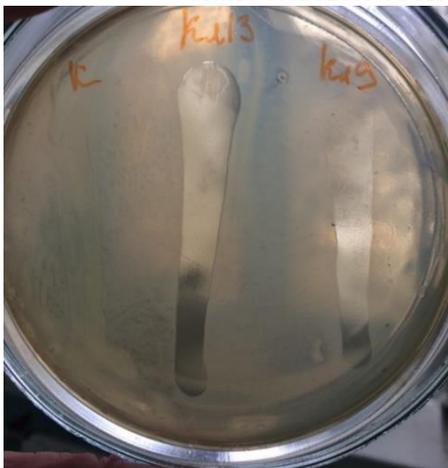


Рисунок 2. Зоны лизиса на газоне культуры *Xanthomonas campestris pv. campestris* B-570 (28 °С, 48 ч)

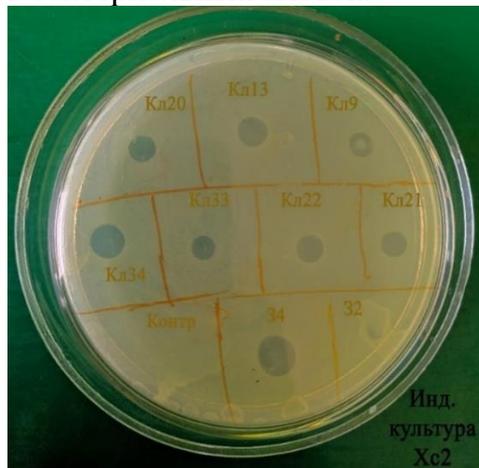


Рисунок 3. Спот-тест выделенных бактериофагов

На первом этапе проводится приготoвление суспензии из изучаемого образца почвы или растения и физ.раствора в соотношении 1:10, после чего данная суспензия оставляется на 20-30 минут для лучшей диффузии.

На втором этапе проводится грубая фильтрация суспензии с использованием ватных фильтров с целью ее очистки от крупных примесей. После чего полученный фильтрат центрифугируется при 3000 об/мин в течении 30 минут.

На третьем этапе проводится окончательная очистка суспензии от бактериальной массы с использованием хлороформа в соотношении 1:10. Обработка проводится в течении 20 мин с учетом времени на осаждении хлороформа на дно пробирки. Затем полученные очищенные субстраты переносятся в стерильные пробирки.

На заключительном этапе производится определение бактериофагов в исследуемом фильтрате методом «агаровых слоев» для чего в 2,5 мл 0,7% МПА предварительно расплавленного и остуженного до 45 °С добавляется 1 мл исследуемого фильтрата и 1-2 капли суточной культуры *X. campestris pv. campestris*. Полученная суспензия выливается на поверхность полноценного МПА. После этого чашки со средой культивируют при 28 °С в течении 24 +/- 1 часов. Наличие бактериофагов определяют по образованию зон лизиса на поверхности МПА.

#### **Изучение основных биологических свойств выделенных фагов бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris***

К основным биологическим свойствам, которые необходимо изучить для отбора фагов с наилучшими характеристиками по следующим показателям: по морфологии негативных колоний; по специфичности; по литической активности; по спектру литической активности.

Изучение морфологии негативных колоний выделенных бактериофагов

проводили на плотных питательных средах, для чего бактериофаги высевались методом агаровых слоев по Грациа с использованием индикаторного штамма Хс2. Данный штамм был выбран для данных исследований поскольку обладал типичными для бактерий *X. campestris pv. campestris* свойствами, а также обладал наилучшими показателями роста в течение 24 часов (до  $1,6 \times 10^8$  м.к./мл). В соответствии с полученными данными выделенные бактериофаги образуют небольшие однотипные, прозрачные негативные колонии округлой или неправильной формы. Размер в диаметре составлял 0,5-2 мм.

Изучение специфичности бактериофагов проводили методом «стекающей капли», с использованием следующих видов бактерий *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas oryzae*. В соответствии с полученными результатами выделенные бактериофаги обладают строгой специфичностью по отношению к бактериям *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Литическую активность выделенных бактериофагов изучали по методу Аппельмана и Грациа. С целью получения достоверных результатов каждый эксперимент проводили троекратно. Индикаторную культуру бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2, выращивали на жидкой среде LB в течение 24 часов. Учет результатов проводили спустя 24 часа культивирования посевов в термостате при 28 °С. Одной из важнейших характеристик выделенных бактериофагов является спектр литической активности или диапазон их действия на штаммы бактерий в пределах вида. Для изучения спектра литической активности выделенных бактериофагов использовали 6 штаммов бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*, выделенных нами из образцов почвы и пораженных растений, а также 5 штаммов, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Исследования проводили методом спот-теста (рис. 3).

Экспериментальным путем установлено, что изучаемые специфичные бактериофаги имеют различный уровень литической активности и различный диапазон действия в отношении к 9 изученным штаммам *Xanthomonas campestris pv. campestris* (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика выделенных бактериофагов

№	Название бактериофага	Литическая активность по методу Аппельмана, количество фаговых частиц в 1 мл фага	Литическая активность по методу Грациа, количество фаговых частиц в 1 мл фага	Спектр литического действия, %
1.	Кл9-УлГАУ	$10^8$	$1,7 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	81,8
2.	Кл13-УлГАУ	$10^8$	$2,1 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$	93,9
3.	Кл20-УлГАУ	$10^7$	$1,4 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	72,7
4.	Кл21-УлГАУ	$10^8$	$1,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$	63,6
5.	Кл22-УлГАУ	$10^7$	$2,4 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$	96,9
6.	32-УлГАУ	$10^6$	$4,2 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$	54,5
7.	34-УлГАУ	$10^8$	$2,2 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$	72,7
8.	37-УлГАУ	$10^7$	$1,6 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$	81,8
9.	Кл33-УлГАУ	$10^8$	$3,7 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$	72,7
10.	Кл34-УлГАУ	$10^9$	$2,6 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$	96,9
11.	С4-УлГАУ	$10^9$	$1,2 \times 10^8 \pm 0,6 \times 10^8$	54,5

Полученные результаты показали, что наибольшей литической активностью обладают бактериофаги Кл9, Кл21, Кл34 и С4 имеющие  $1,7 \times 10^8$ ,  $1,5 \times 10^8$ ,  $2,6 \times 10^8$  и  $1,2 \times 10^8$  фаговых частиц в 1 мл фага соответственно, а наибольшим спектром

литического действия в отношении изучаемых культур обладают бактериофаги Кл9-УлГАУ и 37-УлГАУ, Кл13-УлГАУ, Кл22-УлГАУ и Кл34-УлГАУ, которые лизировали изучаемые штаммы бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* в 81,8%, 93,9% и 96,9% случаев соответственно.

Для дальнейших работ, посвященных конструированию фагового биопрепарата, нами был отобран бактериофаг Кл34-УлГАУ, имеющий наиболее высокий титр литической активности ( $2,6 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$ ) и обладающий наиболее широким среди изученных бактериофагов спектром литического действия (96,9% изученных бактериальных культур).

### Определение основных технологических параметров изготовления биопрепарата на основе выделенных бактериофагов

Основными технологическими параметрами изготовления и контроля фаговых биопрепаратов, являются такие показатели, как способ очистки бактериофага от производственной культуры бактерий без изменения его основных биологических свойств, количественное соотношение бактериальной культуры и фага, оптимальное соотношение между активностью фага и временем пассажа, температура культивирования и способ очистки бактериофага от производственной культуры бактерий без изменения его основных биологических свойств. От данных параметров зависит эффективность производственного процесса и конечная концентрация бактериофага в биопрепарате.

Таблица 2 – Зависимость титра бактериофага от соотношения фаг/культура

Количество внесенной культуры, мл на 0,2 мл фага	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Титр бактериофага Кл34-УлГАУ, БОЕ/мл	$1,6 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$

Таблица 3 – Зависимость титра бактериофага от времени пассажа.

Наименование бактериофага	Время пассажа, часы	Литическая активность бактериофага по Грациа, БОЕ/мл
Кл34-УлГАУ	8	$1,2 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^6$
	12	$1,3 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^7$
	16	$1,5 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^7$
	20	$1,0 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^8$
	24	$2,4 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$
	28	$3,4 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	32	$1,1 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$
	36	$3,9 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$

По результатам проведенных исследований установлено, что наиболее оптимальным соотношением фага и культуры для бактериофага Кл34-УлГАУ являются 1:2 и 1:3 о чем свидетельствуют представленные в таблице 2 данные. При данных соотношениях фага и культуры были получены практически идентичные результаты. Оптимальное время культивирования бактериофага Кл34-УлГАУ при температуре 28 °С находится в пределах 24-32 часов, поскольку в данном диапазоне достигается наивысшая концентрация бактериофага и значительного изменения литической активности не происходит. В связи с этим оптимальным в качестве технологического параметра для изготовления фагового препарата считаем время пассажа 24 ч. (табл. 3).

Таблица 4 – Оптимальные температурные показатели культивирования бактериофага Кл34-УлГАУ

Фаг	Температура культивирования фага						
	12 °С	16°С	20°С	24°С	28°С	32°С	36 °С
	Наличие лизиса						
Кл34-УлГАУ	-	-	+	+	+	+	-

Таблица 5 - Литическая активность бактериофага Кл34-УлГАУ после очистки суспензии от бактерий различными методами (БОЕ/мл)

Метод очистки	Штамм бактерий					
	Хс1	Хс2	Хс9	Хс12	Хс18	Хс22
Обработка трихлорметаном (1/10, 20 мин)	$1,3 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
Обработка температурой (62 оС, 20 мин)	$1,0 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
Фильтрация (величина пор 0,1 мкм)	$1,4 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
Фильтрация (величина пор 0,22 мкм)	$1,4 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$

Диапазон оптимальной температуры культивирования бактериофага Кл34-УлГАУ находится в пределах 20 – 28 °С. Отметим, что после культивирования пробирок при 12 °С помимо отсутствия помутнения в исследуемых пробирках, в контрольных его также не наблюдалось, что свидетельствовало об отсутствии роста культуры при данных температурных параметрах (табл. 4). Наилучшим методом очистки суспензии от бактериальных клеток является фильтрацию через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм (табл.5). Приведенные технологические параметры считаем оптимальными для изготовления фагового биопрепарата *X. campestris pv. campestris*.

#### Технология изготовления и контроля биопрепарата на основе бактериофага *Xanthomonas campestris pv. campestris* Кл34-УлГАУ

Изготовление биопрепарата проводится путем культивирования бактериофага Кл34-УлГАУ на жидкой питательной среде LB с производственной культурой *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 по технологическим параметрам, определенным ранее (табл. 2-5).

Перед началом изготовления проверяется соответствии производственного штамма бактериям *Xanthomonas campestris pv. campestris* по биологическим свойствам. Изучается активность индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ после хранения к производственному штамму *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 и проводится пассирование индикаторного бактериофага в зависимости от активности индикаторного бактериофага после хранения.

Общий процесс изготовления и масштабирования производства предлагаем проводить в 3 этапа.

1 этап. 2 мл индикаторного бактериофага в концентрации  $10^8$  БОЕ/мл вносят в колбу, содержащую 45 мл жидкой питательной среды LB, после чего туда же добавляют 4 мл свежей производственной культуры бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2. В качестве контроля используется пробирка, содержащая 4,5 мл жидкой питательной среды LB, в которую внесли 0,4 мл производственной культуры и 0,2 мл стерильного бактериологического бульона. Смеси термостатируют в течение 24 часа при температуре 28°С. Положительный результат учитывают при визуальном осмотре – питательная среда в колбе с бактериофагом должна оставаться прозрачной. Полученные бактериофаги центрифугируют при 3000 об/мин и

фильтруют с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм и определяют их литическую активность. После этого переходят к этапу 2.

2 этап. 20 мл индикаторного бактериофага, полученного по результатам 1 этапа, вносят в колбу, содержащую 450 мл жидкой питательной среды LB, после чего туда же добавляют 40 мл свежей производственной культуры бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2. В соответствии с 1 этапом проводят постановку контроля и инкубируют посеы. Полученные бактериофаги центрифугируют при 3000 об/мин и фильтруют с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм и определяют их литическую активность. Далее переходят к этапу 3.

3 этап. 200 мл индикаторного бактериофага, полученного по результатам 2 этапа, вносят в колбу большого размера, содержащую 4,5 л жидкой питательной среды LB, после чего туда же добавляют 400 мл свежей производственной культуры бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2. В соответствии с 1 этапом проводят постановку контроля и инкубируют посеы. Полученные бактериофаги центрифугируют при 3000 об/мин и фильтруют с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм и определяют их литическую активность.

По окончанию наработки бактериофагов производится их контроль. Контролируются показатели чистоты фаголизата, определяется итоговый титр бактериофага, проводится изучение специфичности и спектра литического действия бактериофага. В случае соответствия контрольной пробы по указанным параметрам производится розлив фаголизата по флаконам и хранение.

#### **Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага**

Для определения оптимальных параметров постановки реакции нарастания титра фага и отработки ее количественных показателей, которые имеют диагностическое значение, был проведен ряд исследований с использованием 24 часовой индикаторной культурой *X. campestris pv. campestris* Хс2 в концентрации от  $10^3$  до  $10^8$  м.к./мл, инкубируемой при температуре  $28 \pm 1$  °С на стерильной жидкой питательной среде LB. В качестве контроля использовалась интактная стерильная жидкая питательная среда LB.

Положительной реакцию считали при увеличении количества БОЕ индикаторного бактериофага в опытной пробе по сравнению с контрольной в 2 и более раза.

По результатам изучения чувствительности РНФ при культивировании в течение 18 часов без предварительного подращивания при начальной концентрации бактериофага Кл34-УлГАУ  $10^4$  БОЕ/мл было установлено увеличение количества БОЕ/мл индикаторного бактериофага при уровне концентрации бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2  $10^7$  м.к./мл в 2,21 раза и при концентрации  $10^8$  м.к./мл в 2,57 раза. В соответствии с ранее установленными критериями оценки реакции нарастания титра фага, данные показатели можно считать диагностическими.

В соответствии с полученными данными предварительное подращивание индикаторной культуры в течение 6, 15 и 24 ч не давало ощутимого результата при работе с искусственно контаминированным образцом, который повлиял бы положительно на конечный результат, при это увеличивалось общее время экспозиции.

Исходя из полученных данных, в соответствии с представленным ранее алгоритмом действий, минимальный время постановки реакции нарастания титра фага составляет 43 часа (30 мин - на подготовительные мероприятия; 18 часов - термостатирование посевов с индикаторной культурой и индикаторным

бактериофагом; 30 мин - высеив содержимого пробирок методом Грация; 24 часа - культивирование на чашках Петри) (рис.4).

### Применение схемы ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris* с применением разработанного биопрепарата

Далее были проведены исследования по калибровке описанной ранее схемы (рис. 4) с целью ее оптимизации при использовании с различными объектами внешней среды (почва, вода, части растений, семенной материал).

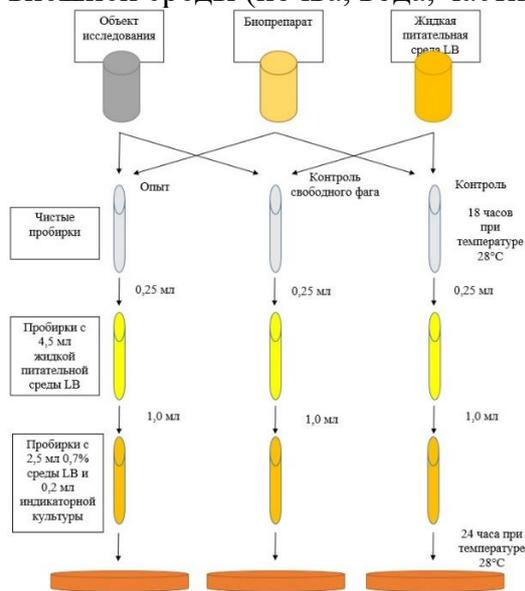


Рисунок 4 - Алгоритм постановки реакции нарастания титра фага с применением разработанного биопрепарата

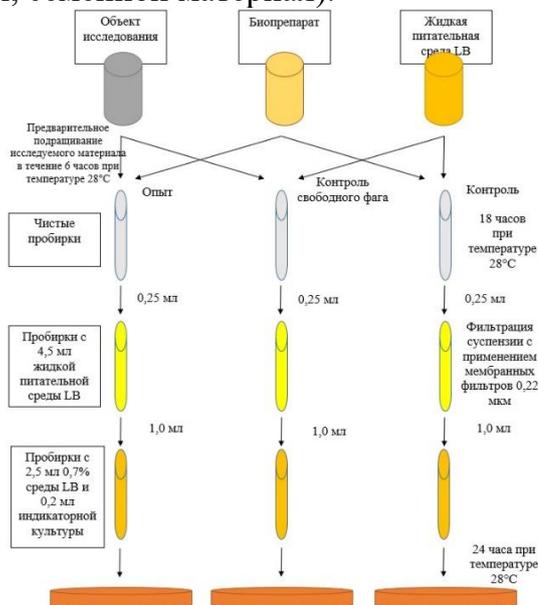


Рисунок 5 – Оптимизированная схема постановки реакции нарастания титра фага с применением разработанного биопрепарата

При работе с нестерильными образцами происходит снижение чувствительности реакции нарастания титра фага. Наилучшим образом бактериофаг Кл34-УлГАУ показал себя при концентрации  $10^5$  БОЕ/мл против  $10^4$  БОЕ/мл при проведении исследований на чистой питательной среде. Учет чувствительности реакции нарастания титра фага затруднялся при низких концентрациях бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*, что в итоге сказалось на полученных результатах. Учитывая данный факт дополнительно был проведен эксперимент с использованием образцов нестерильной почвы, контаминированных бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* в концентрации  $10^5$  м.к./мл и дополнительно культивированных при температуре 28 °С в течении 6, 12, 18 и 24 часов. По итогам проведенных опытов было установлено, что предварительное подращивание исследуемого нестерильного материала, контаминированного бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* оказывает положительное влияние при времени экспозиции в течение 6 и 12 часов.

Наиболее эффективной постановка реакции нарастания титра фага с целью индикации бактерий *X. campestris pv. campestris* в нестерильных образцах является при следующих параметрах:

- проводится предварительное культивирование исследуемого материала в течение 6 часов с целью повышения исходного титра бактерий *X. campestris pv. campestris* в исследуемом материале;
- рабочее разведение бактериофага Кл34-УлГАУ составляет  $10^5$  БОЕ/мл;

- содержимое пробирок с исследуемыми образцами по окончании периода инкубирования в присутствии бактериофага Кл34-УлГАУ фильтруется с применением мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22  $\mu\text{m}$  GV).

Исходя из полученных данных, в соответствии с представленным ранее алгоритмом действий, минимальный время постановки реакции нарастания титра фага составляет 2 суток (49 часов) (30 мин - на подготовительные мероприятия; 6 часов (время предварительного культивирования исследуемого материала); 18 часов - термостатирование посевов с индикаторной культурой и индикаторным бактериофагом; 30 мин - высеив содержимого пробирок методом Грация; 24 часа - культивирование на чашках Петри) (рис.5).

### Исследование с помощью РНФ образцов растений и почвы

Для апробации предложенного алгоритма было отобрано 30 образцов почвы и капусты из хозяйств, где наличие бактериоза было отмечено в предыдущие годы.

По результатам проведенных исследований установлено, что увеличение титра индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ более чем в два раза произошло при исследовании 7 образцов почвы и капусты. В дальнейшем из образцов с положительным результатом РНФ были выделены и изучены штаммы на основе описанной ранее бактериологической схемы выделения и идентификации, модифицированной тестом с применением разработанного биопрепарата на основе бактериофага (рис. 6).

Апробированная схема реакции нарастания титра фага с использованием индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ позволяет достоверно определить наличие в субстрате бактерий *X. campestris pv. campestris*. В остальных 23 образцах, исследованных по схеме, предложенной на рисунке 14, бактерии *X. campestris pv. campestris* обнаружены не были.

### ВЫВОДЫ

1. Выделено 13 штаммов бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* при исследовании 54 образцов почвы, полученных с полей и фермерских хозяйств, занимающихся выращиванием сельскохозяйственных культур семейства Капустные и 91 образца капусты с признаками поражения бактериозом.

2. Из образцов почвы и с поверхностных частей капусты с признаками поражения от сосудистого бактериоза с полей г. Ульяновска и Ульяновской области выделено 10 изолятов бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Все выделенные бактериофаги являются активными по отношению к изученным бактериям *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

3. Изучены основные биологические свойства выделенных изолятов бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris*. В соответствии с полученными данными выделенные бактериофаги образуют небольшие однотипные, прозрачные негативные колонии округлой или неправильной формы размером 0,5-3 мм в диаметре. Выделенные бактериофаги специфичны исключительно в отношении бактерий

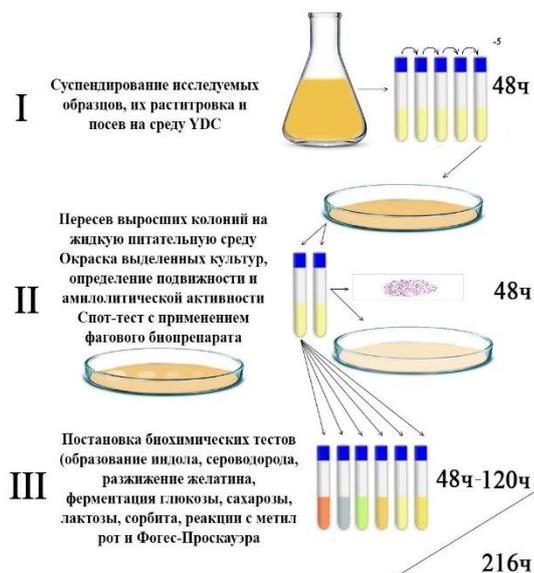


Рисунок 6 – Экспресс-метод выделения и идентификации бактерий *X. campestris pv. campestris* с применением разработанного биопрепарата

*Xanthomonas campestris pv. campestris*. Все выделенные фага обладают разным уровнем литической активности в диапазоне от  $10^6$  до  $10^8$  БОЕ/мл по методу Грациа. Спектр литической активности для отдельных бактериофагов находится в диапазоне 54,5-96,9% изученных культур бактерий.

4. Определены технологически параметры изготовления фагового биопрепарата *Xanthomonas campestris pv. campestris* на основе бактериофага Кл34-УлГАУ, производственный штамм - *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2. Нарботка фагов идет на жидкой питательной среде LB. Оптимальный температурный режим культивирования - 28 °С. Оптимальное соотношение бактериофага Кл34-УлГАУ и штамма *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 – 1:2, т.е. 0,1 мл бактериофага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 24 часа. Очистка бактериофагов от бактериальных клеток осуществляется методом фильтрации с использованием мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм.

5. Разработана технология изготовления, контроля и хранения фагового биопрепарата на основе бактериофага *Xanthomonas campestris pv. campestris* Кл34-УлГАУ, включающая 4 основных этапа: проверка соответствия производственного штамма бактериям *Xanthomonas campestris pv. campestris* по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам; изучение активности индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ к производственному штамму после хранения и его пассирование; изготовление и масштабирование производства биопрепарата; контроль биопрепарата по показателям чистоты фаголизата, итогового титра бактериофага, специфичности и спектра литического действия, проводится розлив по флаконам и хранение. Биопрепарат представляет собой стеклянный флакон с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей и осадка. Титр не ниже  $10^8$ . Срок годности бактериофагов при температуре не менее 2-4 °С 12 месяцев.

6. Создана схема ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* методом реакции нарастания титра фага с использованием разработанного биопрепарата на основе бактериофагов Кл34-УлГАУ, позволяющая обнаружить бактерии в объектах окружающей среды при концентрации  $10^4$  м.к./мл в течение 49 часов.

7. Разработан экспресс-метод выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* на основе их биологических свойств и с применением разработанного биопрепарата, позволяющая идентифицировать микроорганизмы в течение 216 часов. Включает в себя 3 основных этапа: выделение чистой культуры бактерий на основе морфологических свойств и особенностей роста на среде YDC; покраска выделенных культур по Граму, изучение подвижности, амилотической активности и постановка спот-теста с использованием разработанного биопрепарата; изучение биохимических свойств выделенных штаммов.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Для выявления бактерий *X. campestris pv. campestris* в концентрации  $10^5$  м.к./г объектов внешней среды и в семенном материале предлагаем использовать биопрепарат, сконструированный на основе бактериофага Кл34-УлГАУ в совокупности с постановкой реакции нарастания титра фага. Время исследования составляет 49 часов при минимальных затратах расходных материалов и экономии трудовых ресурсов.

2. Идентификацию бактерий *X. campestris pv. campestris* предлагаем проводить с использованием высокоспецифичного бактериофага Кл34-УлГАУ методом Отто или постановкой спот-теста.

3. Разработанные схемы ускоренной индикации и идентификации бактерий *X. campestris pv. campestris* предлагаем использовать как лабораторный метод приемочного контроля образцов почвы, воды, растений и семенного материала на наличие возбудителя бактериального заболевания.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Майоров, П.С. Изучение влияния отдельных компонентов питательной среды на рост бактерий *Xanthomonas campestris* // Перспективные этапы развития научных исследований: теория и практика: сборник материалов III Международной научно-практической конференции (15 июля 2019 г.), Том I – Кемерово: ЗапСибНЦ, 2019 – С. 31-33

2. Майоров, П.С. Подбор физических факторов инактивации бактерий *Xanthomonas campestris* / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Материалы Международной научной конференции «Молодежь и наука XXI века». 13 декабря 2018 года. Том III. Ульяновск, УлГАУ. - 2018. – С. 32-34

3. Майоров, П.С. Выделение, идентификация и изучение биологических свойств бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Журнал «Естественные и технические науки». – М.: «Спутник+». - 2018. - №4 (130). – С. 25-30

4. Майоров, П.С. Разработка схемы выделения бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. Campestris*/ П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики (серия Естественные и технические науки). – 2019. - №6. – С. 20-25

5. Майоров, П.С. Исследование образцов растений и почвы на наличие бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* с использованием РНФ / П.С. Майоров, Д.А. Васильев // Инновационные технологии и технические средства для АПК. – 2019. – С.135-138

6. Майоров, П.С. Основные технологические параметры изготовления биопрепарата для борьбы с возбудителем сосудистого бактериоза крестоцветных / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. - № 1(49). – С. 60-64

7. Майоров, П.С. Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* с применением бактериофага в лабораторных условиях / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. - № 3. – С. 13-17

8. Maiorov P. Identifying the main technological parameters for bio-product exemplified by bacteriophage *Xanthomonas campestris pv. campestris* K134–UTSAV / P. Maiorov, N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, E.Sh. Mallyamova, A.A. Nafeev, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, I.L. Obukhov, B.I. Shmorgun // Ambient Science, 2020: Vol. 07(1)