

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 H₂S 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.

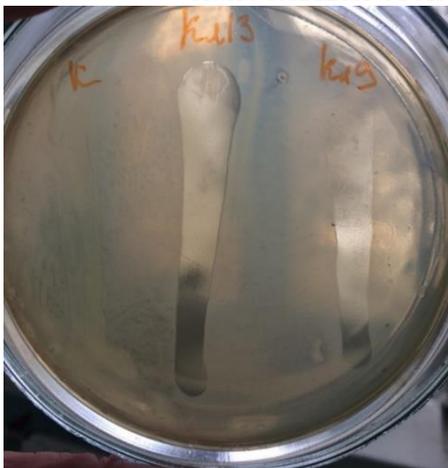


Рисунок 2. Зоны лизиса на газоне культуры *Xanthomonas campestris pv. campestris* B-570 (28 °С, 48 ч)

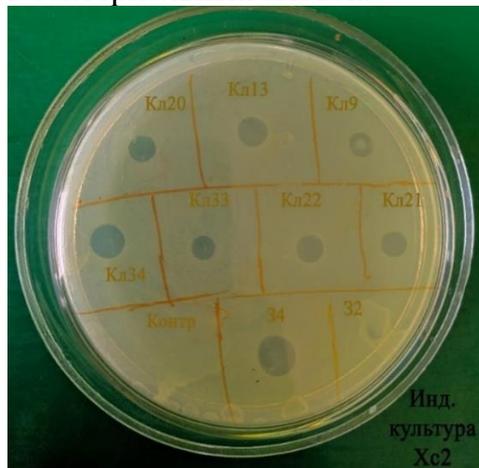


Рисунок 3. Спот-тест выделенных бактериофагов

На первом этапе проводится приготовлении суспензии из изучаемого образца почвы или растения и физ.раствора в соотношении 1:10, после чего данная суспензии 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 Грация 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 Грация. 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 Грация, 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	$1,3 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^7$
	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
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 ± 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).

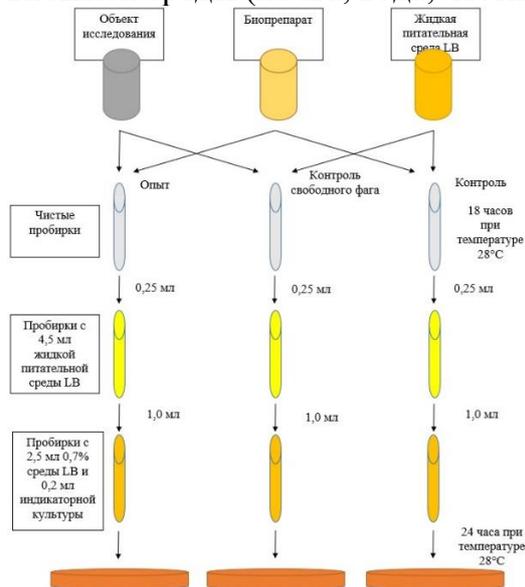


Рисунок 4 - Алгоритм постановки реакции нарастания титра фага с применением разработанного биопрепарата

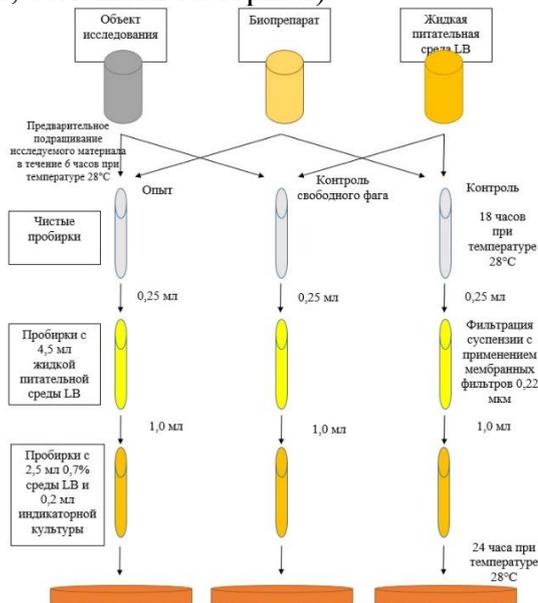


Рисунок 5 – Оптимизированная схема постановки реакции нарастания титра фага с применением разработанного биопрепарата

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 μm 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 - высев 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

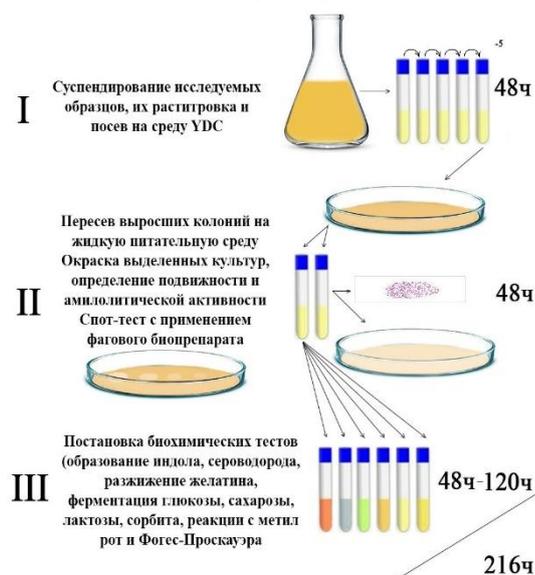


Рисунок 6 – Экспресс-метод выделения и идентификации бактерий *X. campestris pv. campestris* с применением разработанного биопрепарата

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)