

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Майоров Павел Сергеевич

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

03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
Васильев Дмитрий Аркадьевич

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ОГЛАВЛЕНИЕ | 2 |
| ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 14 |
| 1.1. Систематика бактерий рода <i>Xanthomonas</i> | 14 |
| 1.2. Биологические свойства бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 17 |
| 1.3. Устойчивость бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> к условиям окружающей среды..... | 22 |
| 1.4. Распространение бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> | 24 |
| 1.5. Фактор патогенности бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> | 27 |
| 1.6. Схемы выделения и идентификации <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 31 |
| 1.7. Бактериофаги и реакция нарастаний титра фага | 34 |
| 1.8. Свойства и особенности бактериофагов <i>Xanthomonas campestris</i> | 38 |
| 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 40 |
| 2.1. Материалы и методы исследований..... | 40 |
| 2.1.1. Материалы | 40 |
| 2.1.2. Методы | 41 |
| 2.2. Результаты собственных исследования | 43 |
| 2.2.1. Изучение тинкторальных, морфологических и биохимических свойств референс-штаммов бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> | 43 |
| 2.2.2. Разработка схемы выделения и идентификации бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> из объектов окружающей среды и изучение их биологических свойств | 53 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.3. Выделение и селекция бактериофагов <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 65 |
| 2.2.4. Изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 74 |
| 2.2.5. Определение основных технологических параметров изготовления биопрепарата на основе выделенных бактериофагов | 83 |
| 2.2.6. Технология изготовления и контроля биопрепарата на основе бактериофага <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> Кл34-УлГАУ | 90 |
| 2.2.7. Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага | 94 |
| 2.2.8. Применение схемы ускоренной индикации бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> с применением разработанного биопрепарата | 103 |
| 2.3. Практическое применение схем ускоренной индикации и идентификации бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> | 111 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 115 |
| ВЫВОДЫ..... | 126 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ..... | 128 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 129 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ..... | 148 |

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВСЭ - ветеринарно-санитарная экспертиза

Xcc – *Xanthomonas campestris pv. campestris*

real-time ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени;

ПЦР – полимеразная цепная реакция (классический метод);

EPS – экзополисахорид

LPS - липополисахорид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

г/л – грамм на литр

БОЕ/мл – бляшкообразующих единиц в миллилитре

М.к. – микробная клетка

М.к./г. – микробных клеток на 1 грамм

Мкм – микрометры

Об./мин – оборотов в минуту

ИФА – иммуноферментный анализ;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

м.к./мл – микробных клеток на миллилитр

рН – показатель кислотности

РНФ – реакция нарастания титра фага

МПБ – мясопептонный бульон

МПА – мясопептонный агар

УФ – ультрафиолет

СВЧ – сверхвысокие частоты

г/л – грамм на литр

LB - среда Luria-Bertani для культивирования микроорганизмов

YDC – питательная среда для культивирования микроорганизмов

УлГАУ – Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.

Столыпина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Сосудистый бактериоз крестоцветных является одним из наиболее опасных заболеваний сельскохозяйственных культур. Он поражает практически все известные растения, относящиеся к семейству Крестоцветные. В частности, это относится к семейству Капустные (Brassicaceae), большинство представителей которого являются возделываемыми культурами, имеющими важное продовольственное значение [1, 2, 3].

Растения семейства Капустные могут быть поражены сосудистым бактериозом на протяжении всего периода вегетации. Данное заболевание обнаруживается во всех регионах выращивания данной культуры. Бактерии *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, являющиеся возбудителем данного заболевания, способны проникать в растение через поврежденные вредителями части растения, корневую систему и водные устьица-гидатоды. Данный вид бактерий вызывает закупорку сосудов растения, в результате чего происходит их потемнение. Растительные ткани, расположенные в непосредственной близости от закупоренных сосудов, со временем, желтеют. В результате заболевания у растений наблюдаются задержки в росте, снижение размеров кочанов, происходит опадение нижних листьев. Болезнь способна прогрессировать в период хранения, что приводит к потерям урожая [4].

Стандартные методы борьбы с данным заболеванием, к которым относят использование семенного материала хорошего качества, севооборот, выращивание менее восприимчивых сортов, не обеспечивают удовлетворительного контроля заболеваний, особенно когда погодные условия благоприятствуют распространению возбудителя [5, 6, 7].

Первые полевые испытания по применению бактериофагов для борьбы с болезнями растений были проведены Томасом [8], который лечил семена кукурузы бактериофагами, выделенными из больного растительного материала. Такая обработка семян оказалась достаточно эффективной и привела к снижению заболеваемости с 18% до 1,4% (фаговых). В 1969, Civerolo и Keil

применяли внекорневую обработку бактериофагами, за счет чего уменьшили тяжесть бактериального заболевания, вызванного бактериями *Xanthomonas pruni* на 86% - 100% [9].

Индикация и идентификация бактерий *Xanthomonas campestris* также является актуальной проблемой, которой посвящены работы авторов Trindade, Grimault, Koenraad, Çavuşoğlu, Corzo [10-14].

В настоящее время применение бактериофагов для идентификации и борьбы с возбудителями бактериальных болезней растений является быстро расширяющимся направлением. В связи с чем бактериофаги могут быть использованы в качестве эффективных антибактериальных мер [15, 16].

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 [17, 18, 19].

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 [20, 21]. Фагодиагностика представляет собой один из перспективных и эффективных методов индикации и идентификации, позволяющий с быстротой и точностью отнести исследуемую бактерию не только к конкретному роду, но и к виду, и даже фаговару [22].

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 [23].

Поскольку современные меры идентификации бактериальных патогенов в сельском хозяйстве ограничены и часто оказываются неэффективными, исследователи указывают на потенциал применения бактериофаговых 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 [24].

Степень разработанности темы. В имеющихся литературных данных приводятся результаты малочисленных исследований, посвященных бактериофагам *Xanthomonas 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. [25, 26]. Среди зарубежных авторов работой по изучению бактериофагов *Xanthomonas campestris* занимались M. D. Sutton, S. Widadi, Renu [16, 27, 28]. Больше количество исследований проводилось в области молекулярной генетики и геномики бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* (Antelo, Michalopoulou, Eichmeier; Ragasova) [29-32]. 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 и задачи исследования. Целью исследований являлась разработка биотехнологических параметров изготовления биопрепарата на основе выделенных и изученных бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* и определение области его практического применения.

Для решения поставленной цели решали следующие задачи:

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 выделение 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, по сравнению другими изученными бактериофагами, наилучшие показатели литической активности, специфичности и 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 использованием разработанного фагового биопрепарата в образцах почвы, растений, воды и посевного материала.

Разработан и апробирован экспресс-метод индикации и идентификации бактерий вида *Xanthomonas campestris pv. campestris* в образцах внешней среды

с использованием созданного биопрепарата на основе бактериофага Кл34-УлГАУ.

Теоретическая и практическая значимость. Использование предложенной схемы индикации и экспресс-метода идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* с применением разработанного фагового биопрепарата открывает возможности их применения в лабораторной практике при оценке котаминирования образцов растений, почвы, воды и семенного материала бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Это позволяет уменьшить затраты времени на проведение исследований до 49 часов и дает возможность проведения необходимых исследований непосредственно на предприятиях-производителях овощной продукции, в частности капусты, устраняя тем самым необходимость проведения подобных исследований у сторонних организаций и снижая экономические затраты предприятия.

На основе результатов проведенных диссертационных исследований была разработана нормативно-техническая документация, включающая «Методические рекомендации по особенностям культивирования, хранения, очистки и концентрации бактериофагов, активных в отношении бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*», «Временную инструкцию по изготовлению и контролю лабораторной серии бактериофага Кл34-УлГАУ для индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*», «Методические рекомендации по ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* методом реакции нарастания титра фага в объектах санитарного надзора» и «Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* из растительного материала и объектов внешней среды с применением специфического бактериофага Кл34-УлГАУ. Разработанная нормативно-техническая документация размещена в виде электронного ресурса на сайте электронной образовательной среды Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина и предназначенная для использования в практической деятельности аспирантами, научными сотрудниками и

лабораториями, специализирующимися в области микробиологии и биотехнологии.

Материалы диссертационной работы используются предприятиями агропромышленного комплекса Ульяновской области, занимающимися выращиванием Капустных культур, 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 исследований. Методологическая основа диссертации представлена анализом современной литературы по изучаемой проблеме и общепринятыми методами проведения лабораторных исследований (экспериментов). В работе применялись микробиологические, биотехнологические методы, с последующей обработкой и научным анализом полученных данных. Диссертационная работы выполнена с использованием современного оборудования и методик, многократно апробированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина: Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, Н.П. Молофеева, Л.П. Пульчеровская, Е.В. Сульдина.

Основные положения, выносимые на защиту.

Выделено 13 штаммов *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.

Селекционировано 10 изолятов бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, выделенных из образцов почвы и капусты с признаками поражения от бактериозов с полей и Ульяновской области. 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*.

Разработана схема ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* в объектах окружающей среды методом реакции нарастания титра фага, позволяющая обнаружить названные бактерии в объектах окружающей среды при концентрации 10^4 м.к./мл в течение 49 часов.

Предложен экспресс-метод выделения и идентификации данных бактерий, с применением разработанного фагового биопрепарата, позволяющий выделить из объектов окружающей среды и идентифицировать бактерии *Xanthomonas campestris pv. campestris* в течение 216 часов.

Диссертационные исследования выполнены в лабораториях кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина.

Личный вклад автора. Результаты исследований, представленные в диссертации, выполнены непосредственно автором. Личный вклад состоит в определении концепции работы, разработке методологии исследований, сборе и подготовке материалов исследований, проведение экспериментов и фиксации результатов, в обработке, обобщении и анализе полученных результатов, в 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 следующих региональных, всероссийских и международных мероприятиях: региональная выставка, посвященная открытию Центра науки, техники и культуры «Тарелка» (Ульяновск, 2015); Международная научно-практическая конференция «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2016); IV Международная конференция «Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику», посвященная 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Владимир, 2016); Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Инновационные технологии и технологические средства для АПК» (Воронеж, 2016); Международный конкурс инновационных проектов молодых ученых «UL-INNOVO» 2017 (Ульяновск, 2017); Международный научный форум «Молодежь и наука XXI века» (Ульяновск, 2017); Международная научно-практическая конференция «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии» (Саратов, 2017); VI Международная научно-практическая конференция «Современные тенденции развития науки и производства» (Кемерово, 2017); IX Международная научно-практическая конференция «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2018); Международный научный форум молодых ученых «Молодежь и наука XXI века» (Ульяновск, 2018).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из которых 4 в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 1 научная работа в журнале из перечня Web of Science.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)», в части пункта 3 и пункта 8.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 155 страницах текста, содержит 34 рисунка и 33 таблицы. Диссертация состоит из введения; обзора литературы; собственных исследований, включающих материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и практического применения схем ускоренной индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris*; заключения; выводов; практических предложений; списка литературных источников (180 наименований, в том числе 139 зарубежных авторов) и приложений.

Благодарность. Автор искренне признателен и выражает благодарность сотрудникам кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ Д.А. Васильеву, Н.А. Феоктистовой, А.И. Калдыркаеву, Н.П. Молофеевой, А.В. Мاستиленко, С.В. Мерчиной, Л.П. Пульчеровской, Н.Г. Барт, С.В. Мерчиной, Е.В. Сульдиной, В.М. Юдиной за помощь в освоении методик проведения лабораторных исследований и методов изучения бактериофагов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Систематика бактерий рода *Xanthomonas*

Бактерии рода *Xanthomonas* были описаны в 1921 году, как *Bacterium vesicatorium*, являющийся патоген томатов в Южной Африке [33]. В дальнейшем последовало большее количество описаний патогенных для растений бактерий, и они были сгруппированы Доусоном в одну группу *Xanthomonas* [34]. Определение видов было достигнуто путем гибридизации ДНК. В 1995 году Vauterin с соавторами сгруппировали 183 штамма *Xanthomonas* на основе их молекулярных маркеров [35]. Род состоит из грамотрицательных растительных патогенов и является частью гамма-подразделения *Proteobacteria*.

Класс *Gammaproteobacteria* был ограничен на основе филогенетического анализа последовательностей 16S рРНК. Класс содержит отряды *Acidithiobacillales*, *Pasteurellales*, *Aeromonadales*, *Alteromonadales*, *Cardiobacteriales*, *Legionellales*, *Chromatiales*, *Thiotrichales*, *Enterobacteriales*, *Oceanospirillales*, *Pseudomonadales*, *Methylococcales*, *Vibrionales* и *Xanthomonadales*.

Порядок *Xanthomonadales* представляет собой грамотрицательные прямые палочки. Эндоспоры не образуют, накопление поли- β -гидроксибутиратных включений отсутствует. Облигатные аэробы. Каталаза положительная. Нитраты не редуцируют, за исключением *Stenotrophomonas*. Продукция оксидазы варьируется. Профили жирных кислот являются сложными. Оптимальная температура 20–35 °С, кроме рода *Thermomonas* (37–50 °С).

Семейство *Xanthomonadaceae* имеет характерные для порядка *Xanthomonadales* свойства. Существует 16 родов: *Arenimonas*, *Chujaibacter*, *Coralloluteibacterium*, *Denitratimonas*, *Frateuria*, *Fulvimonas*, *Kaistibacter*, *Luteimonas*, *Lysobacter*, *Nevskia*, *Pseudoxanthomonas*, *Rehaibacterium*,

Rhodanobacter, *Schineria*, *Silanimonas*, *Stenotrophomonas*, *Thermomonas*, *Vulcaniibacterium*, *Xanthomonas* и *Xylella* [36].

Первоначально род *Xanthomonas* был разделен на виды и патовары на основе специфичности хозяина [37]. Позже морфологические, физиологические и биохимические характеристики были использованы для разделения изолятов Ксантомонов на восемь фенотипических групп, одной из которых был *X. campestris* [38]. Вид *Xanthomonas campestris* тем самым группирует бактерии, связанные с крестоцветными растениями.

Xanthomonas представляет собой четко определенный, однородный род. Это особенно актуально в настоящее время, когда близкородственные, но отличительные виды, *Xanthomonas maltophilia*, как описано Swings и соавт., размещены в своем собственном роде *Stenotrophomonas* [39-40]. Кроме того, вид *Xanthomonas ampelina* был перенесен в *Xylophilus* в семействе *Pseudomonadaceae*, из которого был удален род *Xanthomonas* [41-42].

В следствии каталогизации последовательностей 16S рРНК род *Xanthomonas* был помещен в *Gammaaproteobacteria* [43].

Патогенные бактерии рода *Xanthomonas*, являющиеся возбудителями болезней растений, известны своим генетическим разнообразием и значительной степенью наносимого ими вреда, вызываемого у почти 400 видов растений [44].

В пределах рода *Xanthomonas* давно известно, что *X. campestris* с его многочисленными патоварами был неоднородным. Некоторые патовары очень похожи, другие демонстрируют четкие различия в фенотипе и генотипе. На основе метода ДНК-ДНК гибридизации 54 патовара, которые считались принадлежащими к *X. campestris*, были выявлены шесть групп и четыре разгруппированных патовара [40, 45, 46]. Расширение этих исследований большим количеством штаммов подтвердило шесть групп и добавило еще 14, что в итоге составило 20 видов в роду в целом [35]. Четыре из них соответствуют существующим видам *X. albilineans*, *X. fragariae*, *X. oryzae* и *X. populi*. Остальные 16 являются производными от гетерогенного *X. campestris*.

По данным ряда авторов бактерии рода *Xanthomonas* по меньшей мере 27 различных видов, которые характеризуются разной вирулентностью и специфичностью к поражаемым растениям [47].

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc) является возбудителем болезни черной гнили у крестоцветных культур, включая все культивируемые растения рода *Brassica* [48, 49]. Черная гниль во всем мире считается самой важной болезнью для овощных культур капусты, включая капусту, цветную капусту и другие. Сообщается о происшествиях со всех континентов, где выращиваются культуры семейства Brassicaceae, в основном в теплых и влажных условиях [49, 50]. Без растений-хозяев бактерии Xcc способны выжить в почве. Бактерии Xcc передаются от растения к растению посредством ветра, насекомых, а также через семена, зараженную почву или растения [49, 51]. Клетки попадают в растения в основном с водой или через раны. Бактерии перемещаются в сосудистой системе растения, приводя к закупориванию сосудов, что влечет за собой появление хлоротических желтых повреждений, являющихся типичными симптомами болезни черной гнили [50].

X. campestris pv. *campestris* можно разделить на девять рас, основываясь на их патогенности на разных сортах *Brassica* [52]. Мировые расы 1 и 4 наиболее распространены, хотя их распределение отличается в разных географических точках. Раса 1 наиболее распространена в Соединенном Королевстве, тогда как раса 4 является доминирующей расой в Португалии, северо-западной Испании и некоторых восточноафриканских странах, таких как Танзания и Уганда [53, 54, 55]. Информация о доминирующей расе в Бельгии отсутствует. Другие расы встречаются редко, но могут быть более распространены у других видов хозяев, которые менее часто обследованы [49].

Kamoun по результатам своих исследований группирует штаммы Xcc в пять рас [56]. Российскими авторами была изучена устойчивость некоторых культивируемых видов капустных растений к наиболее распространенным расам Xcc. Российские штаммы патогена принадлежат в основном к расам 1, 3 и 4 [25].

Широкие геномные исследования видов *Xanthomonas* показали наличие трех систем секреции, влияющие на факторы патогенности данных бактерий: система секреции типа II (T2SS), система секреции типа III (T3SS) и система секреции типа IV [49]. Кроме того, бактерии *Xanthomonas campestris pv. campestris* производят биопленку, которая важна для их фитопатогенного жизненного цикла [57, 58]. Существенным для образования бактериями *Xcc* биопленки является экзополисахарид (EPS) ксантан. Небольшие количества ксантана образуются после того, как бактерии заражают растения. Однако обильные количества ксантана вырабатываются на более поздних стадиях инфекции [59]. На ранних стадиях ксантан необходим для инфекции ткани мезофилла и сосудистой системы. Тем не менее, слишком большое производство ксантана на ранних стадиях инфекции способно помешать прилипанию бактерий к клеткам растения или препятствовать движению клеток через растение. С другой стороны, после заражения большие количества ксантана защищают бактерии от неблагоприятной растительной среды и стрессовых реакций, таких как активные формы кислорода [59].

Ксантан является важным фактором вирулентности, поскольку он защищает бактериальную клетку от обезвоживания и улучшает адсорбцию растения. Из-за вязкости ксантана образуются клеточные агрегаты, которые блокируют сосудистую систему растения, что приводит к увяданию листьев, что рассматривается как важный шаг в развитии болезни [60].

1.2. Биологические свойства бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*

Клетки *X. campestris pv. campestris* представляют собой прямые палочки, размером 0,5-0,8 x 1,0-2,0 мкм. Являются подвижными посредством полярного жгутика. Грамотрицательные, споронеобразующие аэробные микроорганизмы. На плотной питательной среде образуют круглые, блестящие, гладкие колонии с ровным краем. Разжижают желатин. Молоко свертывают. Гидролизуют крахмал. Нитраты не восстанавливают. Способны продуцировать кислоту из

галактозы, декстрозы, арабинозы, мальтозы, ксилозы, сахарозы, глицерина, раффинозы и маннита. Каталазоположительные и оксидазоотрицательные. Оптимальная температура роста 25-30 °С, максимальная достигает 38–40 °С, минимальная – 4-5 °С. Первичная инфекция сосудистого бактериоза происходит через неперегнившие растительные остатки и семена [61].

Колонии всех видов *Xanthomonas* обычно гладкие, круглые, целые и маслянистые, по крайней мере, когда молодые, но могут показать поверхностные маркировки, такие как бороздки и стать лопастными, когда старше. Наличие слизистых, маслянистых колоний является существенным признаком для дискриминации определенных патогенных бактерий рода *Xanthomonas* от сапрофитов [62]. Иногда встречаются колонии мутантов с отличительным внешним видом. Они могут быть менее слизистыми и иметь тенденцию к более грубым колониям или могут быть зубчатыми [63, 64].

Бактерии рода *Xanthomonas* являются хемоорганотрофными. В связи с чем для роста всех видов данных бактерий необходимо содержание в питательных средах минералов, азота аммония, и соответствующих источников углерода, такого, как глюкоза [65].

Для бактерий *Xanthomonas* аспарагин может служить источником азота при поступлении глюкозы, но он не может служить одновременно источником углерода и азота [66, 67]. Данный факт может использоваться в качестве диагностического теста для отличия бактерий рода *Xanthomonas* от других бактерий *Enterobacteriaceae*, имеющих желтый пигмент и многих видов бактерий рода *Pseudomonas*, которые способны расти на среде с аспарагином, выступающим в качестве единственного источника и углерода, и азота [68-71]. Таким же образом глутамат или аланин могут служить для бактерий *Xanthomonas* [72].

Желтые пигменты присутствуют у всех видов *Xanthomonas*, однако безпигментные штаммы также встречаются. Безпигментные мутанты могут появляться непосредственно в культуре [73-74]. Исследования некоторых авторов показали, что отсутствие *xanthomonadins* (уникальный класс

каротиноидоподобных пигментов), и других признаков, таких, как производство EPS, имеют ограниченное воздействие на эпифитное выживание и инфицирование растений-хозяев [75, 76]. Хотя наличие желтого пигмента является важной характеристикой для идентификации, его отсутствие не исключает организм из рода, если другие характеристики соответствуют данному роду. Starr и Stephens, изучив ряд изолятов, принадлежащих *X. campestris*, обнаружили, что все они содержали один или несколько пигментов. Пигменты высвобождались из разрушенных клеток с той же скоростью, что и компонент цитоплазматической мембраны, что свидетельствует об их прикреплении к клеточной оболочке [77, 78].

Наличие пигмента ксантомонадина и способность ксантановой продукции являются уникальными характеристиками рода *Xanthomonas* [79].

В тоже время, по данным ряда ученых, основные различия бактерий *Xanthomonas* от других фитопатогенных бактерий заключаются в наличии пектолитической и амилолитической активности [35, 80, 81].

По данным российских авторов 60 изученных штаммов рода *Xanthomonas*, включая *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. malvacearum*, *X. phaseoli*, *X. vasculorum* и *X. arboricola*. не отличались по родовым, морфологическим и физиологическим признакам, синтезировали кислоту из галактозы, раффинозы, маннозы, ксилозы и показали отрицательную реакцию с метил- глюкозидом. Штаммы различались по реакции с глицерином - производство кислоты отмечалось в интервале от 3 до 18 дней. Все штаммы использовали натриевую соль лактата, тартрата, цитрата, малата, сукцината и оксалата. Ни один штамм не показал способности расти на глицине или поли-бета-оксибутирате. Точечный рост наблюдался у ряда штаммов на аспарагине и лейцине [82].

Другие авторы отмечают, что бактерии *Xcc* используют глюкозу окислительно (аэробно), так как среда в открытых пробирках желтеет сверху. В качестве источника углерода способны использовать цитрат. Крахмал гидролизуют. Имеют положительную реакцию каталазы, гидролаза аргинина,

выделяют H₂S не позднее 14 дня. Разжижение желатины происходит в течение недели. Образуют липазы. Бактерии производят аммиака, о чем свидетельствует накопление желтого осадка, при добавлении реактива Несслера в пептонную воду с бактериями спустя 48 часов культивирования. Нитрат не восстанавливают. Бактерии не производят индола. Роста бактерий в 6% NaCl не отмечено [83].

Время деления бактерий в большей степени зависит от температуры. Для деления одной бактерии рода *Xanthomonas* требуется около 2 часов, при этом самое короткое время деления происходит при температуре около 27 °C [84].

Подробная характеристика некоторых видов бактерий *Xanthomonas* приведена в Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2005 [79].

В таблице 1 приведены сводные данные свойств видов бактерий рода *Xanthomonas*.

Таблица 1 - Сводные данные об основных свойствах видов рода *Xanthomonas*

| Виды | Свойства | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------------------|----------|----------|-------------|------------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|------------------|----------|-------------------------|------------------------|------------------------------|-------------|----------|---------|---------|----------|---------|---------|-----------|---------|-----------|----------|
| | Окраска по Граму | Каталаза | Оксидаза | Подвижность | Образование H ₂ S | Образование индола | Реакция Фогеса-Проскауэра | Реакция с метил-рот | Разжижение желатина | Гидролиз казеина | крахмала | Рост в присутствии NaCl | Восстановление нитрата | Потребность в факторах роста | Ферментация | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | глюкозы | сахарозы | маннита | лактозы | мальтозы | ксилозы | сорбита | арабинозы | маннозы | галактозы | фруктозы |
| <i>campestris</i> | - | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | До 6% | - | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + |
| <i>albilineans</i> | - | + | - | + | - | | | | + | - | - | До 0,5 | | | + | | | - | + | + | | - | + | d | - |
| <i>axonopodis</i> | - | + | - | + | + | | | | - | - | + | До 1% | | | + | | | | | | | - | - | - | - |
| <i>citrii</i> | - | + | - | + | ? | | | | ? | ? | + | ? | | | + | | | | | | | ? | ? | ? | ? |
| <i>fragariae</i> | - | + | - | + | - | | | | + | - | + | До 1% | | | + | | | - | + | - | | - | + | - | + |
| <i>phaseoli</i> | - | + | - | + | - | | | | ? | - | + | ? | | | + | | | | | | | ? | ? | ? | ? |
| <i>populi</i> | - | + | - | + | + | | | | - | d | ? | До 0,5 | | | + | | | - | + | - | | - | + | + | + |
| <i>oryzae</i> | - | + | - | + | - | | | | - | d | ? | До 0,5 | | | + | | | - | + | ? | | d | + | + | + |

«+» - реакция положительная, «-» - реакция отрицательная, «d» - слабая реакция, «?» - данных недостаточно

Все микроорганизмы, в настоящее время относящиеся к роду *Xanthomonas*, являются возбудителями болезней растений. Однако, некоторые авторы, помимо того, обнаруживали изоляты, которые, по-видимому, непатогенные [85]. Часть данных изолятов была идентифицирована как микроорганизмы, растущие эпифитно, например, *X. axonopodis pathovar phaseoli*, выделенные из бессимптомных сорняков [86]. Большинство из тех, которые были проанализированы с помощью SDS-PAGE анализа белков и жирных кислот, могут быть идентифицированы с принятыми в настоящее время *Xanthomonas spp.* Но идентификация до уровня патовара в отсутствие теста на патогенность является не допустимой [85].

1.3. Устойчивость бактерий *Xanthomonas campestris* к условиям окружающей среды

Патоген способен выживать в семенах растений до следующего сезона [61]. Возбудитель способен до двух лет сохраняться в растительных остатках, сохраняя способность инфицировать здоровые растения [87].

Во внешней среде патоген распространяется с зараженными семенами, поливной водой, насекомыми, орудиями труда, растительными остатками, дождем и ветром, не способен выживать в почве вне пораженных частей растения. Способен сохраняться в семенном материале более 10 лет [88].

При этом, к основным причинам увеличения вредоносности бактерий-возбудителей болезней растений на основных сельскохозяйственных культурах можно отнести в первую очередь появление новых, более агрессивных видов бактерий [89].

По данным М. Mwangi, после изучения 19 соединений на их способность подавлять рост бактерий, результаты проведенных экспериментов указывают на отсутствие негативного воздействия на бактерии *Xanthomonas campestris* таких соединений, как Aztreonam,

Nitrofurantoin, Pyridoxine-HCl, Tobramycin, Trimethoprim, Tyrothricin, Phosphomycin, Methyl green, Cefazolin, Cephalexin, 5-Fluorouracil [90].

Авторы отмечают, что обработка растений соединениями на основе молока (сыворотка и сырое молоко) снижает устойчивость бактерий *Xanthomonas* [91].

Те же авторы указывают на увеличение тяжести заболевания от *X. campestris pv. campestris* при обработке растений известковой серой [91].

Рядом авторов была изучена антагонистическая способность культур *Bacillus* в отношении возбудителя сосудистого бактериоза капусты методом перпендикулярных штрихов. По результатам проведенных исследований было получено, что только один штамм, PS11 *Bacillus pumilus*, подавлял развитие *Xanthomonas campestris pv. campestris* [92].

Другие авторы отмечают, что бактерии рода *Bacillus* имеют способность ингибировать рост бактерии *Xanthomonas*. Однако, не все антагонисты ингибировали фитопатогенные штаммы с одинаковой эффективностью, и не все штаммы имели одинаковую чувствительность к антагонистам. Этот факт авторы объясняют генетической изменчивостью как фитопатогенов, так и антагонистов [93].

По данным авторов, применение медьсодержащие пестициды в поле или теплице обычно является эффективным средством борьбы с фитопатогенами, в частности бактериями рода *Xanthomonas*, только на ранней стадии поражения из-за быстрого возникновения резистентности бактерий к препаратам [88].

По данным Choi было обнаружено, что бактерии рода *Xanthomonas* чувствительны к стрептомицину, ампициллину, новобиоцину, эритромицину, олеандомицину, ванкомицину, рифампицину и оксимицину (все в концентрации 5 мкг / мл), пенициллину G (40 мкг / мл), а пимарицин не ингибировал рост до 100 мкг / мл [94]. В исследовании *X. campestris* было также обнаружено, что штаммы чувствительны к стрептомицину, в дополнение к канамицину, гентамицину, окситетрациклину и эритромицину

[95]. Другие антибиотики, активные в отношении бактерий рода *Xanthomonas*, включают аскамицин, ксантобацидин и чонгшенмицин [96, 97, 98].

В антагонизме бактерий рода *Xanthomonas* участвуют липопептиды, о чем свидетельствует обнаруженная корреляция между гемолитической активностью и ингибированием роста фитопатогенной [91].

Полевые испытания показали эффективность штамма *Bacillus subtilis* ВВ против *X. campestris* pv. *campestris*. Однако, количество осадков и тип почвы, а также кормовых растений и патогенных штамма влияние на деятельность биоуправления [99].

Аналогичные результаты были получены в ходе исследования в Танзании, в ходе которого к корням капусты были применены три различных штамма бацилл [6]. В другом исследовании также сообщали о биоконтрольном потенциале ризосферных бактерий *Pseudomonas* и *Bacillus* в теплицах при капельном поливе или при обработке семян в сочетании с пропитыванием почвы [100].

1.4. Распространение бактерий *Xanthomonas campestris*

Бактерии рода *Xanthomonas* заражает большое разнообразие растений, включая некоторые коммерческие, такие как артишок, хлопок, слива, баклажаны, брокколи, капуста, цветная капуста, брюссельская капуста, маракуйя, горчица, нектарин, перец, перец чили, редька, капуста, помидор, люцерна, персик и др [36].

Бактерии из рода *Xanthomonas* вызывают пятнистости листьев и других пораженных органов (гоммоз хлопчатника и др.), поражение сосудов (сосудистый бактериоз капусты), гнили плодов (бактериоз огурца). Многим видам рода свойственно наличие патологических вариантов внутри вида (*X. campestris*, *X. axonopodis*, *X. oryzae*, *X. vesicatoria*) [101].

Виды и патовары бактерий *Xanthomonas* вызывают заболевание, по меньшей мере, у 124 однодольных и 268 двудольных, но без голосеменных,

папоротников или низших растений [102]. Ареалы растений-хозяев и географическое распределение этих патогенов сильно различаются [103].

Большинство видов и патогенов вызывают пятнистость листьев, по крайней мере, на начальном этапе. Бактерии распространяются очень слабо и могут ограничиваться сосудами листьев, вызывая угловатые пятна на листьях у двудольных. Системные инфекции приводят к увяданию, гибели побегов или язвам на ветках и ветвях или к сочетанию этих симптомов, а в случае серьезного поражения растение может погибнуть. Степень развития симптомов и их тип могут также зависеть от условий окружающей среды и сорта растения-хозяина [104].

Черная гниль, вызываемая бактериями рода *Xanthomonas*, поражает горчицу, капусту, брюкву, репу, капусту, брокколи, цветную капусту, брюссельскую капусту, редьку и капусту [99].

Бактерии рода *Xanthomonas* способны вызывать бактериальные болезни сои [105].

Бактерии *Xanthomonas campestris* были обнаружены при поражении манго бактериальной черной пятнистостью [35].

Бактериальные заболевания, вызываемые бактериями рода *Xanthomonas* на зерновых культурах, относятся к числу наиболее вредных заболеваний, передаваемых семенами [106].

Авторы указывают на выделение бактерий рода *Xanthomonas* с масличного рапса в 2012 году [25].

Как отмечается Егоровой в период 2001 – 2008 гг сотрудниками ВНИИ фитопатологии впервые для России был выделен и изучен бактериальный патоген злаковых культур, относящийся к роду *Xanthomonas*. Данный патоген вызывал поражение ячменя, пшеницы, овса, ржи, а также подсолнечника и крестоцветных культур [107].

Рядом авторов бактерии рода *Xanthomonas* были обнаружены при изучении бактериальной пятнистости листьев риса, томатов, бактериальной пятнистости сливы, бактериальном ожоге лука, герани, цитрусовых [108]. X.

campestris был выделен из партий семян риса (с наибольшей частотой), пшеницы и ржи [106].

Известно, что бактерии рода *Xanthomonas* могут выступать патогеном для растений и семян ячменя, овса, пшеницы, ржи, сахарной свеклы, кукурузы, моркови, льна, подсолнечника, люцерны, гороха и фасоли, крестоцветных растений и картофеля [61, 89].

Бактерии рода *Xanthomonas* иногда обнаруживались в сточных водах и рвах вокруг полей зараженных растений [103].

Одной из самых разрушительных болезней цветной капусты является черная гниль, вызываемая *Xanthomonas campestris pv campestris*. Этот патоген был выделен из листьев, демонстрирующих типичные симптомы черной гнили на равнинах Кералы, Индия [83].

Сосудистый бактериоз, вызываемый бактерией *Xanthomonas campestris*, способен поражать все крестоцветные культуры. Болезнь причиняло большой вред выращиванию крестоцветных культур в Нижнем Поволжье, на Северном Кавказе, Украине, в Воронежской, Курской и других областях центральной зоны [108].

Первое описание болезни было сделано Гарманом в 1894 году в Кентукки, США. Черная гниль способна поражать все культивируемые семейства капустных и вероятно являются самым важным заболеванием урожая капустных в мире [2].

К основным признакам бактериальной инфекции, вызываемой бактериями *Xanthomonas campestris*, можно отнести ненормальное развитие побегов, листьев и других органов, угнетение роста растения в целом [109].

Помимо культурных растений бактерии рода *Xanthomonas* способны вызывать инфекцию у сорняков, относящихся к Крестоцветным, таких как дикая редька (*Raphanus raphanistrum*), клоповник виргинский (*Lepidium virginicum*), черная горчица (*Brassica nigra*), сурепка (*Brassica campestris*), воронья лапа (*Coronopus didymus*) и другие [87].

Бактерии рода *Xanthomonas* имеют распространение по всем мире, в особенности в районах, где выпадает много осадков, при средней температуре от 24 до 30 °С [100, 110].

Так, возбудитель черной гнили был обнаружен в южном регионе Мозамбика. *X. campestris* pv. *campestris* был обнаружен в образцах семян и листьев из районов, где выращивалась капуста в Махотасе и Чокве [111].

Болезнь черной гнили нанесла серьезный ущерб многим растениям крестоцветных, особенно капусте и цветной капусте в районе Тама, Токио, Япония [112].

X. campestris pv. *campestris* был выделен из пораженных черной гнилью листьев цветной капусты, репы и капусты на экспериментальной ферме Токийского сельскохозяйственного и технологического университета в 1966 году, а также из больных листьев капусты в 1976 году. Патогенность этих бактериальных изолятов была подтверждена прививанием иглой укола листья здоровой капусты [112].

В Индии зафиксированы потери урожая капусты от бактерий *Xcc* до 50%. Тяжесть заболевания была зафиксирована у восприимчивых к капусте сортов, таких как Golden Acre и Pride of India [113].

Черная гниль, вызванная *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* была обнаружена на 28 происследованных полях для капусты в пяти основных районах выращивания капусты в Непале в 2001 году и на четырех полях для цветной капусты в двух районах и в ложе из листьев горчицы [1].

1.5. Фактор вирулентности и инфицирование растений бактериями

Xanthomonas campestris

Бактерии *Xanthomonas campestris* через поры листьев и механические повреждения в них способны поражать растения любого возраста. В результате этого у пораженных растений происходит отставание в росте и пожелтение листьев. Характерными признаками сосудистого бактериоза являются темно-окрашенные сосуды листьев и черешков, что хорошо видно

при поперечном разрезе. Важным признаком бактериоза также является увядание нижних листьев, что зачастую приводит к их опадению. Часто происходит заражение в период вегетации взрослых здоровых растений, что приводит к распространению болезни от места первичной инфекции к центру листовой пластины. При этом происходит пожелтение пораженной ткани листа. [61].

Распространение инфекции может происходить путем проведения полива растений, с пылью, с каплями дождя, через насекомых-вредителей и сельскохозяйственные орудия труда [61].

Оптимальными условиями, способствующими развитию сосудистого бактериоза, принято считать среднюю температуру в 20-25 °С и влажность воздуха свыше 80%. Развитие болезни особенно сильно происходит жарким летом с большим количеством дождей. Период инкубации непосредственно на растениях составляет от 10 до 14 дней [114].

Критической точкой в жизненном цикле бактерий рода *Xanthomonas*, как и в случае других патогенов растений, является переход к новому растению-хозяину, особенно в период выживания [115]. Такое выживание может быть обеспечено многими способами: посредством семян, растительных остатков, многолетних растений-хозяев, эпифитно и сапрофитно в почве, через насекомых [116, 117]. Многие бактерии рода *Xanthomonas* выживают путем передачи с семенным материалом [118].

Бактерии могут переноситься детритом вместе с семенами, в семенной оболочке или глубже в тканях самого семени. Возбудитель сосудистого бактериоза капусты (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) не теряет жизнеспособности в семенах в течение трех лет [109, 119].

Бактерии особенно часто проникают в растение через водяные поры или микроповреждения на поверхности листьев и далее по сосудам распространяются по всему растению, что приводит к потемнению сосудистого кольца [108].

В сельском хозяйстве одним из наиболее частых факторов переноса инфекционных агентов является деятельность человека, в том числе посредством зараженного посадочного материала или инструментов, колес транспортных средств и даже пасущихся животных [120, 121].

Пересыпкин отмечает, что период вегетации бактерии с больных растений на здоровые переносятся ветром, каплями дождя, насекомыми и слизнями. Проникают в растения через водяные поры, устьица, механические повреждения и повреждения, нанесенные насекомыми (особенно капустной мухой). Попадая в сосудистую систему, они образуют зооглеи (слизистые образования, образующиеся при жизнедеятельности бактерий) и вызывают увядание растений. В полевых условиях при достаточной влажности инкубационный период продолжается 10 - 15 дней, а при низкой влажности - до 30 дней [122].

Согласно данным Попковой в качестве источников инфицирования выступают семена и посадочный материал, растительные остатки, а также нарушение сроков посева растений и сбора урожая. При этом в качестве условий, способствующих развитию патогенеза автор выделяет нейтральную или щелочную среду, характерную для фитопатогена, наличие оптимальной температуры роста, скопление капельно-жидкой влаги на листьях растения и нарушение правильного питания растения [109].

Авторы указывают на то, что патогенность и вирулентность бактерий *Xanthomonas* зависит от морфологии колоний [63].

По данным авторов метионин может играть роль в патогенезе, поскольку исследования метилтиопропионовой кислоты (МТРА) - фитотоксина, продуцируемого *X. axonopodis pathovar manihotis*, показали, что метионин является предшественником МТРА [65].

Протеазодефицитные мутанты показали значительную потерю вирулентности в тестах на патогенность и считается, что эндоглюканаза играет роль, хотя и незначительную, на ранних стадиях развития болезни [124]. Некоторые ферменты, участвующие в деградации пектина и

полигалактуроната играют ограниченную роль в патогенезе, хотя Boher обнаружили, что в процессе заражения клеточные стенки средних, первичных и вторичных растений деградировали из-за целлюлолитической и пектолитической активности [125-127]. Кроме того, их результаты позволяют предположить, что бактериальные экзоклеточные полисахариды были вовлечены в деградацию поверхности растительных клеток [128]. Аналогичные результаты были сделаны в других исследованиях [129, 130].

Dow и соавторы обнаружили, что локус патогенности в *X. campestris* pv. *campestris* содержит два гена, регулирующих биосинтез липополисахарида (LPS) в бактериальной клетке [130]. Они предположили, что LPS защищает бактерии от антибактериальных веществ, вырабатываемых растением на ранних стадиях заражения. Последующие исследования ранних фаз инфекции выявили LPS, продуцируемый *X. axonopodis* pathovar *manihotis*, на наружной поверхности бактериальной оболочки и в областях средних пластин растения в непосредственной близости от патогена [128]. Также полагают, что липополисахариды участвуют в индукции гиперчувствительного ответа и устойчивости у восприимчивых хозяев [131-133]. Они также могут иметь значение в эпидемиологических исследованиях, поскольку сообщалось о различиях в LPS *X. albilineans*, выделенных в разных местах [134].

Системно зараженные растения в центре стебля на срезе имеют слизистые образования [135].

Первоначально хлоротические поражения, которые позднее переходят в V-образные очаги, почернение сосудов, высыхание очага поражения, увядание листьев, были обычными симптомами, наблюдаемыми у растений, зараженных локально. Карликование зараженного растения не было редкостью. Обесцвечивание сосудистого пучка также замечено [135].

Способность возбудителя размножаться в сосудистой системе растения играет основную роль в выражении симптомов черной гнили. По-видимому,

закупоривание сосудов у растений, инфицированных *Xcc*, происходит из-за накопления фибриллярного материала [2].

Автор отмечает, что первые симптомы черной гнили наблюдались только через 6 недель после посева [136].

Инкубационный период у *Xanthomonas campestris* составляет от 2 до 8 суток. При этом если возбудитель проникает через устьица, последующий срок развития заболевания удлиняется, если через механические повреждения в тканях растения – укорачивается [137].

1.6. Схемы выделения и идентификации *X. campestris* pv. *campestris*

Большинство патогенных для растений бактерий способны расти на стандартных питательных средах, предпочтительно растительного происхождения. Использование белковых сред часто приводит к образованию нежизнеспособных измененных форм бактерии. [109].

Rombouts S. в качестве методики выделения бактерий *Xanthomonas* использовала посев на неспецифичную среду РАФ, дополненную сахарозой (10 г/л), с целью проверки типичного желтого слизистого роста ксантомонад [138].

Для идентификации могут быть использованы различия в колониальной морфологии. Среда СКТМ может быть использована для дифференциации штаммов *X. vesicatoria* с перца и томатов [139]. После 2-3 дней роста на этой среде все штаммы образуют круглые, приподнятые колонии желтого цвета, окруженные прозрачным кольцом. Внутри данного кольца на 4 сутки можно увидеть мельчайшие кристаллы.

Другие авторы рекомендуют использовать дополнительно к питательному агару дрожжевого экстракта (5 г/л). Для растительных патогенов, растения сами представляют собой идеальное «средство обогащения» и изоляция наилучшим образом проводится на неселективных средах [70, 140].

Также авторами для изоляции бактерий *Xanthomonas* рекомендуется использование среды YSP2 или среда SP3 с добавлением циклогексимида и пенициллина G [68, 141].

Полу-селективные среды для бактерий *Xanthomonas* также были описаны: СКТМ для *X. vesicatoria* [139]. Селективность зависит от циклогексимида, бацитрацина, неомицина, цефалексина, 5-фторурацила, тобрамицина и Твина 80.

Авторы для выделения бактерий *Xanthomonas* из почвы и растительного материала использовали среду XPSM6, которая подавляет рост сапрофитных бактерий и грибков, обычно встречающихся в почвенных образцах [142].

Использование питательного агара, дополненного дезоксихолатом натрия (200 мг / л), было использовано для селективного выделения *X. vesicatoria*, а также среды, содержащей карбоксиметилцеллюлозу и желатин [143, 144].

К.В. Попкова описывает следующий метод выделения возбудителя из пораженной ткани. Для начала производится вырезание стерильным ножом или скальпелем пораженных тканей растений. Далее материал измельчается и помещается на подготовленную питательную среду. При поражении сосудистой системы растения, для выделения бактерий отбирается участок с начальными признаками поражения, после чего отобранный материал измельчается и высевается на подготовленную питательную среду [109].

Учеными описаны различные методы выделения возбудителя, вызывающего сосудистый бактериоз капусты. Бактерии выделялись из естественно зараженных растений, с типичными симптомами. Пораженные образцы тщательно промывали и зараженные участки разрезали на мелкие кусочки, стерилизуя поверхность 70% этиловым спиртом в течение минуты. Эти образцы затем промывали тремя сменами стерильной воды и измельчали на стерилизованном предметном стекле для получения бактериальной суспензии. Эту суспензию высевали на среду картофельно-сахарозно-

пептонного агара (PSPA) (картофельно-сахарозно-пептонно-агаровая среда; картофель 300 г, пептон, 2 г; сахароза 20 г; KH_2PO_4 0,2 г; NaHPO_4 0,5 г; нитрат кальция 0,5 г; KCl 0,05 г; сульфат железа (0,05 г; агар 20 г / л), чтобы получить отдельные изолированные колонии бактерии. Чашки инкубировали в течение 48 ч при комнатной температуре. Характерные для бактерий *Xanthomonas* отдельные колонии отбирали на основании их цвета, текучести и слизистости и проводили выделение чистой культуры путем многократного посева на среде PSPA. После чего чистую культуру поддерживали в пробирках на скошенном агаре [135].

Группа исследователей в качестве жидкой питательной среды с целью культивирования бактерий *X. campestris* использовала среду следующего состава: пептон – 10 г, сахароза – 10 г, дрожжевой автолизат – 5 г, натрия хлорид – 5 г, вода – 1000 мл. Культивирование производится в течение 48 часов при температуре 28°C [3].

Авторы для идентификации штаммов бактерий использовали анализ метиловых эфиров жирных кислот [90].

Другие для выделения бактерий *Xanthomonas* промывали растительный материал в водопроводной воде и затем высушивали при комнатной температуре между листами абсорбирующей бумаги. Бактерии выделяли из листьев капусты, демонстрирующих симптомы черной гнили, путем вырезания срезов с краев поражений, которые помещали на предметное стекло с каплей стерильного физиологического раствора (0,85% NaCl) и наблюдали на наличие бактериальной слизи. Петли бактериальной суспензии наносили на mCS20ABN и агар FS [5]. Проверка стерильности с использованием солевого раствора была включена в качестве отрицательного контроля. Планшеты инкубировали при 28° С в течение 3-4 дней и наблюдали на наличие предполагаемых колоний Хсс. Штаммы бактерий, выделенные из срезов семян и листьев, которые показали положительный результат на гидролиз крахмала на чашках с агаром mCS20ABN и FS, наносили штрихом на агар YDC и инкубировали при 28 °С в течение 2 дней.

Одиночные желтые пигментированные колонии переносили на другую чашку с агаром YDC для обеспечения чистоты [5, 111].

Один или два образца листьев, представляющих одно или два растения из каждого поля, были отобраны для выделения возбудителя от типичных V-образных поражений. Из каждого образца листа 0,5-1 см² ткани листа иссекали стерильным скальпелем с края пораженный участок и помещали в каплю стерильного 0,85% физиологического раствора на 5 минут. Петлей с физиологической суспензией осуществляли посев штрихом на питательном крахмальном циклогексимидном агаре (NSCA) и инкубировали при 28 °С в течение 48-72 часов и наблюдали рост типичных для *X. campestris* колоний (бледно-желтые, слизистые, крахмал-гидролизующие). Типичную колонию с каждой чашки пересекали на дрожжевой агар с карбонатом кальция (YDC) и затем переносили в сахарозно-пептонный агар (SPA) для тестирования вязкости [1].

1.7. Бактериофаги и реакция нарастаний титра фага

Впервые спонтанное растворение бактериальной культуры было обнаружено в 1892 г. В. Крузе и С. Пансини при изучении роста пневмококка. Позже русским бактериологом М. Ганкиным было обнаружено бактерицидное действие воды рек Джамна и Ганг в Индии. Ученый обнаружил сохранение бактерицидных свойств воды этих рек после ее фильтрования. В 1898 г. Н. Ф. Гамалея впервые описал лизис бактерий под влиянием перевиваемого агента и назвал данное явление бактериолизом [145].

Открытие вирусов, паразитирующих на бактериях, принадлежит английскому микробиологу Ф. У. Туорту и франко-канадскому исследователю Ф. д'Эреллю, который помимо прочего ввел термин «бактериофаг».

Главной заслугой Ф. д'Эрелля признается то, что он впервые выдвинул идею применения бактериофагов с целью лечения болезней [146].

Потенциал фагов в борьбе с бактериальными патогенами был немедленно признан, и были разработаны методы лечения для борьбы с болезнями человека. Открытие пенициллина, который обеспечивал защиту от более широкого круга патогенов, в сочетании с неудачными испытаниями фаготерапии и Второй мировой войной привело к потере интереса к фаготерапии в западном мире. Там фаги использовались только как инструмент для понимания фундаментальной молекулярной биологии и как векторы для горизонтального переноса генов [15]. Тем не менее, фаготерапия получила дальнейшее развитие и широкое применение в Восточной Европе и бывшем Советском Союзе [147]. Однако в последние десятилетия проблема устойчивости к антибиотикам возрастает, и все больше стран пересматривают фаготерапию [148]. В сельском хозяйстве также стремление к более устойчивой практике привело к возобновлению интереса к фаготерапии для борьбы с бактериальными заболеваниями [149, 150].

Изучением бактериофагов широко занимались на территории СССР, несмотря на появление антибиотиков и снижения интереса к фагам. По данному направлению проводили исследования такие известные ученые, как Н.Н. Жуков-Вережников, В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб, Т.И. Тихоненко, Я.И. Раутенштейн, В.Н. Крылов, И.П. Ревенко и другие [20, 151].

В соответствии с многочисленными литературными данными, бактериофаги могут быть использованы в качестве природных антимикробных агентов, позволяющими эффективно бороться с бактериальными инфекциями как у людей, так и у сельскохозяйственных животных и растений, в геномной инженерии и т.д. [152, 153, 154].

В общем виде области применения бактериофагов можно подразделить на:

- идентификацию микроорганизмов, в том числе и для диагностики инфекционных заболеваний;

- профилактику некоторых инфекционных заболеваний с помощью препаратов бактериофагов;
- лечение некоторых инфекционных болезней (фаготерапии);
- выявления бактериальных загрязнений (фагоиндикацию) [145].

В общем смысле под фагоиндикацией бактерий подразумевается ускоренный метод обнаружения бактерий-возбудителей инфекционных болезней в исследуемом материале (вода, почва, корма, пищевые продукты, растения и т.д.) с использованием специальных индикаторных бактериофагов. Принципиальное действие фагоиндикации микроорганизмов заключается в выраженной избирательности литического действия бактериофагов в отношении конкретных видов бактерий, в связи с чем данный метод получил название «Реакция нарастания титра фага» (РНФ) [155].

Первыми, кто в 1924 году обнаружил, что фильтрат жидкости, собранной из разлагающейся капусты, ингибировал рост бактерий, вызвавших гниение, *Xanthomonas campestris pv campestris* Маллман и Хемстрит. В 1925 году Kotila и Coons продемонстрировали, что бактериофаги, выделенные из почвы подавлен рост *Pectobacterium carotovorum subsp atrosepticum*, возбудителя болезни черноногих картофеля. Они провели биоанализы и успешно предотвратили гниение клубней картофеля путем совместной инокуляции фага фитобактерией. Кроме того, они изолировали фаги, активные против *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum* и *Agrobacterium tumefaciens*, из ряда источников окружающей среды, таких как речная вода и почва [156, 157].

Первые полевые испытания были проведены Thomas против увядания кукурузы Стюарта. Он обработал семена кукурузы, зараженные патогеном *Pantoea stewartii*, фагами, выделенными из больного растительного материала. Эта обработка семян была достаточно эффективной и привела к снижению заболеваемости с 18% (без лечения) до 1,4% (фаг). Почти полвека

спустя Civerolo и Keil использовали различные методы обработки листы фагов и снижали степень бактериального пятна (*Xanthomonas pruni*) на проростках персика на 86-100% [158].

Использование бактериофагов для борьбы с болезнями является быстро расширяющейся областью защиты растений с большим потенциалом для минимизации мер химического контроля. Бактериофаги являются предпочтительными, поскольку они широко представлены в природе, самовоспроизводятся и могут быть нацелены на бактериальные рецепторы, необходимые для патогенеза. Более того, они нетоксичны для эукариот и специфичны для определенных видов или штаммов бактерий, не повреждая других полезных представителей местной флоры [16]. Отчеты Valogh также указывают на то, что наблюдается оживление интереса к использованию фагов для борьбы с болезнями растений [159].

Выраженная специфичность действия бактериофагов в отношении конкретной группы бактерий и сравнительно простой количественный учет фагов позволили В.Д. Тимакову и Д.М. Гольдфарбу разработать новый метод диагностики с использованием бактериофагов, получивший название реакция нарастания титра фага (РНФ). РНФ основан на изменение численности популяции бактериофага в результате его контакта с исследуемым субстратом. Из-за характерной специфичности, бактериофаг способен размножаться исключительно на гомологичных бактериях. При этом наличие сопутствующей микрофлоры никаким образом не влияет на данный факт. Это позволяет обнаружить конкретную бактерию-возбудителя без необходимости выделения чистой культуры [160].

При использовании этого метода применяется специально отобранный бактериофаг, обладающий наилучшими показателями специфичности, высокой адсорбционной способностью, высоким титром и урожайностью. Метод является экспрессным и разработан для обнаружения патогенных микробов в медицинской микробиологии.

Данный метод может быть использован и в растениеводстве при определении зараженности растительных тканей тем или иным возбудителем бактериоза.

Принципиальная схема реакции нарастания титра фага (РНФ) включает в себя следующие этапы:

1. Суспендирование исследуемого материала с питательной средой, подходящей для взаимодействия клеток бактерий и бактериофага;
2. Добавление в суспензию определенного количества индикаторного бактериофага;
3. Культивирование полученной смеси при оптимальной температуре и в течение определенного времени;
4. Очистка исследуемой суспензии от сторонней микрофлоры;
5. Учет степени возрастания количества внесенного бактериофага.

Реакция нарастания титра фага является простым и удобным, при необходимом уровне чувствительности и специфичности, методом диагностики, который позволяет за относительно короткий срок обнаружить искомые бактерии в различных субстратах, без необходимости их выделения в чистые культуры [161].

В настоящее время параметры постановки РНФ отработаны для индикации следующих видов бактерий: *Citrobacter*, *E.coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus* [162-166].

Применение бактериофагов Хсс в биоконтроле в настоящее время отсутствует, хотя изучение данного вопроса является актуальным и исследования ведутся в различных странах, включая Россию. Так, некоторые фаги, способные лизировать Хсс, были описаны в Японии, США, России, Индии и др. и Тайвань [112, 167, 168].

1.8. Свойства и особенности бактериофагов *Xanthomonas campestris*

По имеющимся данным бактериофаги *Xanthomonas campestris* образуют небольшие прозрачные бляшки диаметром 1-3 мм, имели

хвостовую часть длиной 70-250 нм и многогранными головками диаметром 50-60 нм [16, 26-28, 169].

Авторам было обнаружено, что большинство фагов Хсс нечувствительно к хлороформу. Было установлено, что оптимальная температура для лизиса и образования бляшек для всех литических фагов составляет 28 ± 2 °С. Было обнаружено, что морфология бляшек почти у всех изолятов одинакова, то есть мала и имеет неправильную форму. Точка термической инактивации была зарегистрирована и оказалась в диапазоне 60-75 ° С в течение 60 мин. Термическая инактивация выше 70 °С также отмечена на фагах *X. euvesicatoria*, фаге *X. campestris* (Liew, 1981) семейства *Myoviridae* и на фагах *X. pruni* [158, 167, 170].

Изучение бактериофага Хсс9SH3 под электронным микроскопом показало наличие у фаг длинного и несжимаемого хвоста и изометрической головки. На основании морфологии или морфотипа фаг может быть помещен в семейство бактериофагов семейства *Siphoviridae* (вирусы dsDNA) [171, 172]

По данным Weiss фаг ХТР1 образует небольшие прозрачные бляшки диаметром 1 мм. Добавление к среде Са (5 мМ), Mg (5 мМ) или Zn (5 мМ) не привело к увеличению размеров бляшек [173]. ХТР1 имеет латентный период около 2 ч, что близко к времени генерации *X. campestris* в экспоненциальной фазе. Затем следует период нарастания 2 часа с размером всплеска от 30 до 35 БОЕ на адсорбированный фаг.

Информации о применении бактериофагов *Xanthomonas campestris* в составе биопрепаратов и их использование в качестве систем для индикации и идентификации соответствующих бактерий в открытых источниках не обнаружено.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

2.1.1. Материалы

Штаммы бактерий. В качестве объектов исследования использовали 5 референс-штаммов *X. campestris* В-570, В-610, В-611, Хсс 14-УГСХА, Хсс 17-УГСХА, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ, а также 13 штаммов (Хс1-УлГАУ, Хс2-УлГАУ, Хс9-УлГАУ, Хс12-УлГАУ, Хс18-УлГАУ, Хс22-УлГАУ, Х1-УлГАУ, Х2-УлГАУ, Х3-УлГАУ, Х4-УлГАУ, Х5-УлГАУ, Х6-УлГАУ, Х7-УлГАУ), выделенных из образцов почвы и капусты с признаками поражения от сосудистого бактериоза 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* NA18, полученные из музея кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина. Все штаммы обладали типичными биологическими свойствами.

Штаммы бактериофагов. 10 изолятов бактериофагов *X. campestris* pv. *campestris* (Кл9-УлГАУ, Кл13-УлГАУ, Кл20-УлГАУ, Кл21-УлГАУ, Кл22-УлГАУ, 32-УлГАУ, 34-УлГАУ, 37-УлГАУ, Кл33-УлГАУ, Кл34-УлГАУ, С4-УлГАУ), выделенных из образцов почвы и капусты с признаками поражения от сосудистого бактериоза 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.

Питательные среды и реактивы. Мясопептонный бульон (МПБ) (Оболенск), мясопептонный агар (МПА) (Оболенск), агар бактериологический (Оболенск), пептон сухой ферментативный (Оболенск), триптон (HiMedia), экстракт дрожжевой (HiMedia), хлорид натрия (AppliChem), карбонат кальция (AppliChem), среды Гисса (Оболенск), лимонно-амиачное железо (AppliChem), сульфат магния (AppliChem), обезжиренное молоко (AppliChem), гидрофосфат калия двузамещенный (AppliChem), гидрофосфат калия однозамещенный (AppliChem), глюкоза (Оболенск), N-N-диметил-пара-фенилен-диамид (AppliChem), бромтимоловый синий (Оболенск), калия гидроксид (AppliChem), реактив Эрлиха, NO₃ (AppliChem), альфа-нафтол (Оболенск), метиловый красный (Оболенск), перекись водорода, растворимый крахмал (HiMedia), желатин (Оболенск), набор окраски по Граму (Оболенск), иммерсионное масло (HiMedia).

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.

2.1.2. Методы

Для выделения, индикации и идентификации бактерий использовали общепринятые бактериологические методы [137, 174, 175]. Изучение культуральных, морфологических и биохимических свойств бактерий *X. campestris* проводили в соответствии с литературными данными [35, 66, 67, 79-81].

Выделение из объектов окружающей среды и изучение биологических свойств бактериофагов проводили по методикам С.Н. Золотухина, Э. Каттер [156, 161]. Для изучения литической активности использовали методы

Аппельмана и Грация [176, 177]. Параметры постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *X. campestris* определяли по методикам, опробованным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ [178, 179]. Конструирование биопрепарата проводили по методу С.Н. Золотухина [161].

Питательные среды готовили в соответствии с прописями:

Среда Кларка (пептон 0,5 г, калия гидроортофосфат 0,5 г, глюкоза 0,5 г, вода очищенная 80 мл).

YDC среда (г/л, вода дистиллированная): дрожжевой экстракт – 10 г, глюкоза – 20 г, CaCO₃ – 20 г, бактериологический агар – 15 г.

LB среда (г/л, вода дистиллированная): триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5г, хлорид натрия – 5 г. Для получения плотной питательной среды добавляли 1,5% бактериологического агара.

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

2.2. Результаты собственных исследования

2.2.1. Изучение тинкторальных, морфологических и биохимических свойств референс-штаммов бактерий *Xanthomonas campestris*

На первом этапе проводили изучение морфологии референс-штаммов В-570, Хсс 14-УГСХА, Хсс 17-УГСХА. Для этого осуществляли посев бактерий на питательную среду YDC. Использование данной питательной среды обусловлено рекомендациями некоторых авторов в качестве оптимальной для роста данного вида бактерий [137, 180]. Культивирование проводили при 28°C в течении 48 часов. Режим и условия культивирования подбирали в соответствии с литературными данными [137, 180].

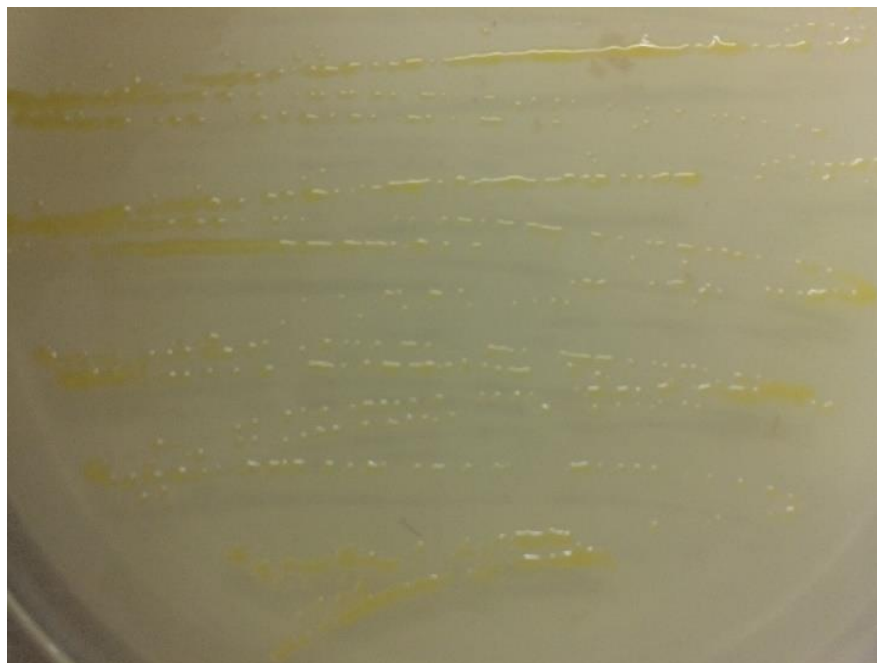


Рисунок 1. Рост на среде YDC (*X.campestris* Хсс 14-УГСХА, 48ч, 28°C)

На питательных средах выделенные культуры образуют круглые, гладкие, блестящие, колонии с ровным краем. Выделяют желтый пигмент (рис. 1).

На втором этапе исследований проводили окраску изучаемых культур по Граму (рис. 2), определяли их подвижность (рис. 3) и амилалитическую активность (рис.4). Помимо этого, проводили определение продукции каталазы и оксидазы (рис. 5).

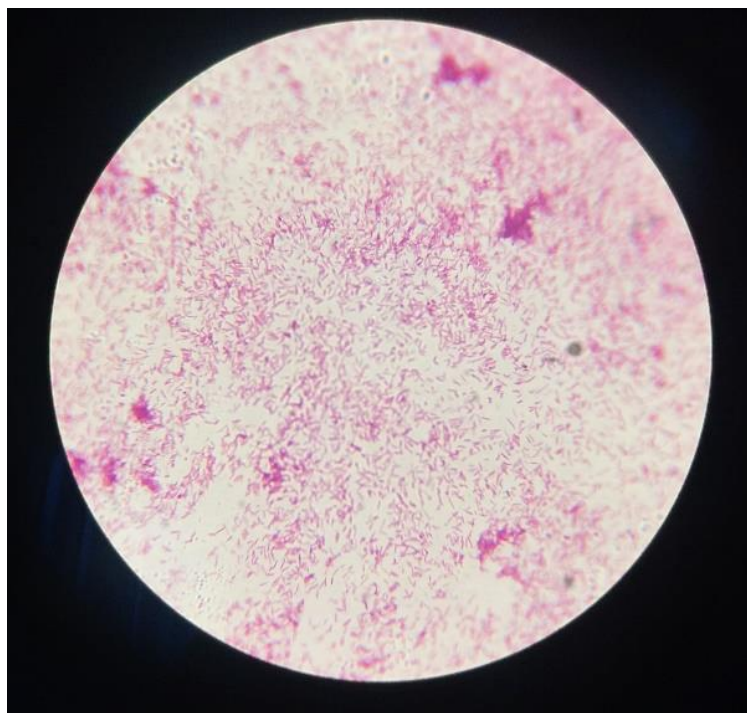


Рисунок 2. Окраска по Граму (*X.campestris* Xcc 17-УГСХА)

Установлено, что изученные культуры представляли собой прямые грамотрицательные бактерии в виде палочек с закругленными краями, одиночные либо соединенные в цепочки. Спор и капсул не образуют.



Рисунок 3. Определение подвижности (*X.campestris* В-570, 48ч, 28°C)

Подвижность бактерий определяли по диффузии исследуемых культур в толщу питательной среды. В соответствии с полученными данные все

исследованные штаммы бактерий *X.campestris* pv. *campestris* являются подвижными.



Рисунок 4. Определение амилалитической активности (*X.campestris* Хсс 14-УГСХА, 48ч, 28°С)

Амилалитическую активность определяли по проявлению прозрачных зон вокруг колоний бактерий, выросших на на крахмалсодержащей среде, после нанесения на нее раствора Люголя. В соответствии с полученными данными исследуемые бактерии проявляли амилалитическую активность.

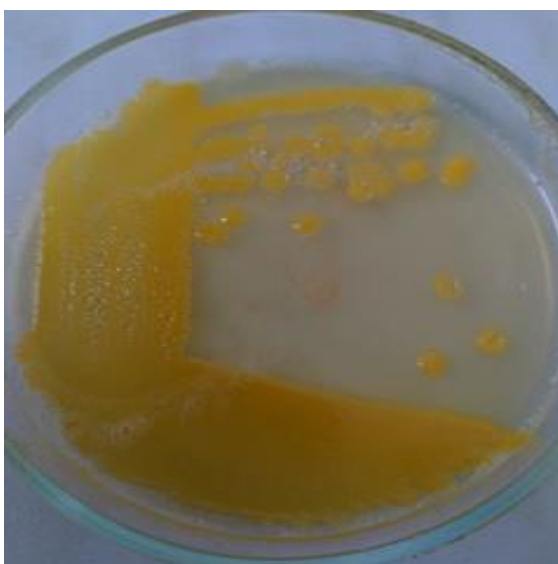


Рисунок 5. Определение каталазы (*X.campestris* Хсс 17-УГСХА, 48ч, 28°С)

Определение каталазы проводили путем нанесения на колонии исследуемых бактерий 3% раствора перекиси водорода и наблюдали за образованием пузырьков газа. Для определения оксидазы использовали полоски бумаги, пропитанные N-N-диметил-пара-фенилен-диамидом. Полученные данные свидетельствуют, что все исследованные штаммы являлись каталазоположительными и оксидазоотрицательными.

На третьем этапе проводили изучение биохимических свойств изучаемых культур. Перечень изучаемых показателей подбирали в соответствии с литературными данными [35, 66, 67, 79-81]. Проводили постановку тестов на образование индола (рис.6), реакцию Фогес-Проскауэра (рис. 7), реакцию с метил-рот (рис. 8) и разжижение желатины (рис. 9), восстановление нитрата (рис. 10). Результаты по данным тестам получали спустя 48 часов культивирования культур при 28°C. Параллельно с этим производили постановку тестов на образование H₂S и определение сахаролитических свойств (рис. 11). Результаты по данным тестам снимались ежедневно в течении 5-7 дней.

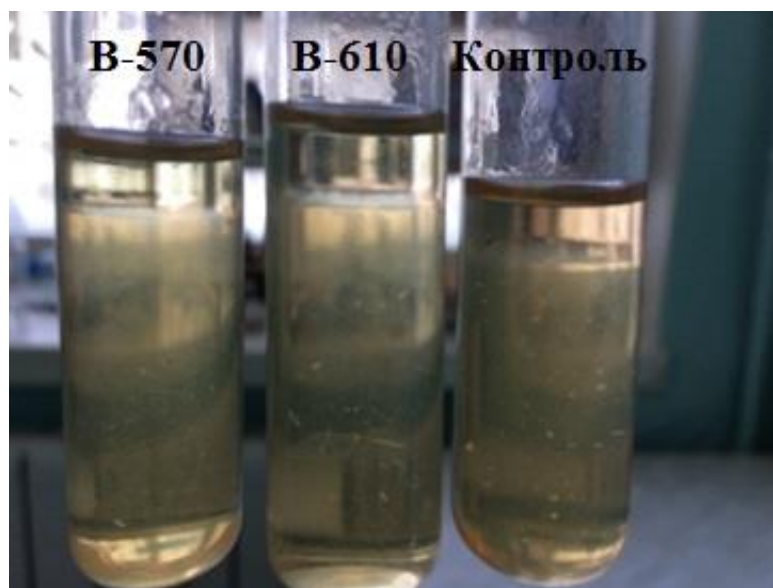


Рисунок 6. Тест на образование индола (48ч, 28°C)

Тест на образование индола проводили с использованием реактива Эрлиха. Отсутствие покраснения в верхнем кольце свидетельствует об отсутствии образования исследуемыми бактериями индола (рис. 6).

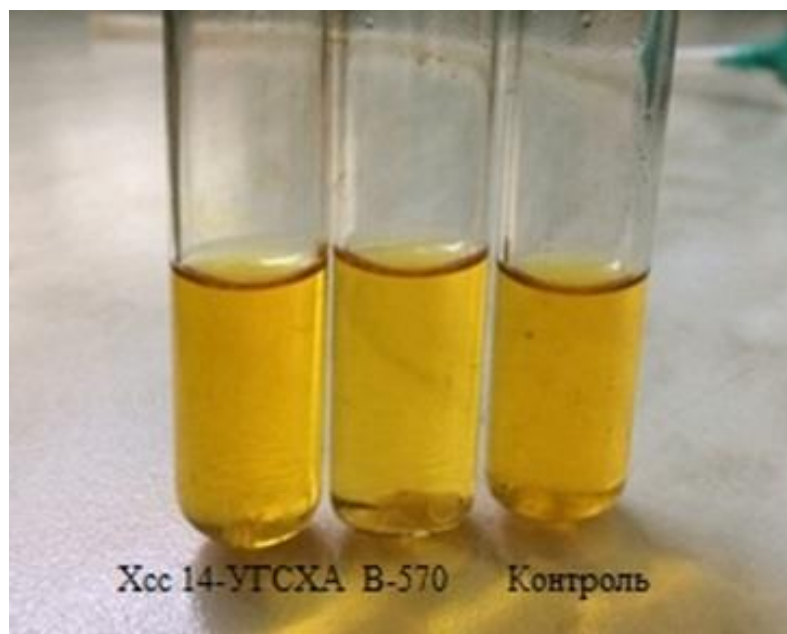


Рисунок 7. Тест на образование ацетона (48ч, 28°C)

Образование бактериями ацетона определяли путем добавления в исследуемы культуры, выросшие на среде Кларка, 0,2 мл 40 % раствора калия гидроксида и 0,6 мл альфа-нафтола. В качестве положительного результата реакции принимали окрашивание среды в красный цвет. Все исследуемые штаммы показали отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра (рис. 7).

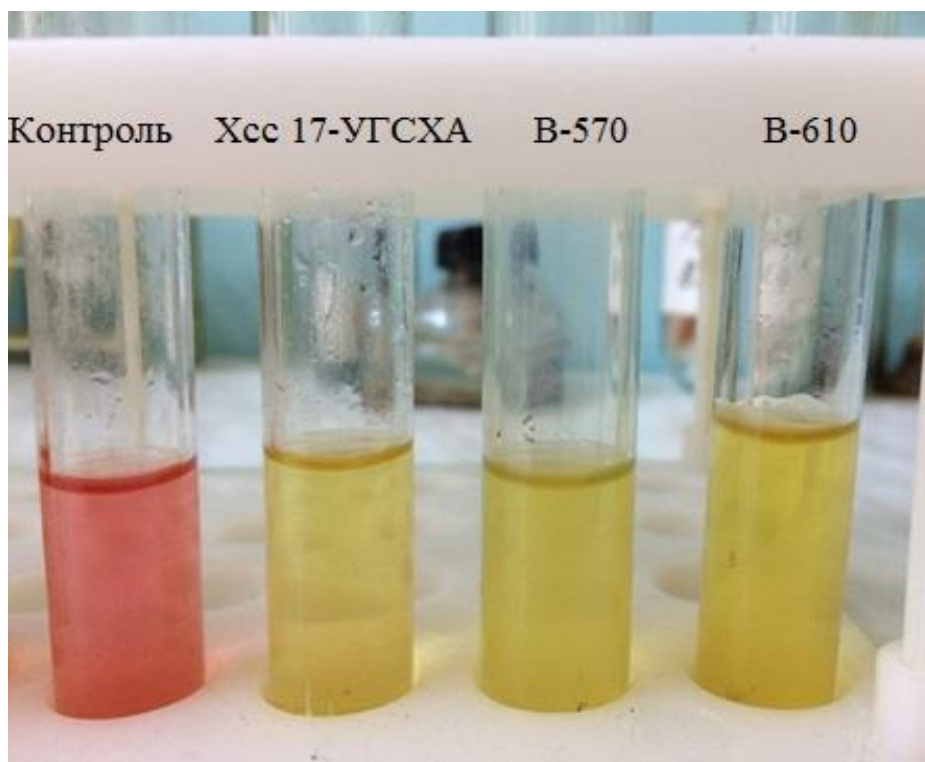


Рисунок 8. Реакция с метил-рот (48ч, 28°C)

Для постановки реакции с метил-рот в пробирку с изучаемым штаммом бактерий, выросшем на среде Кларка, добавляли 4-5 капель соответствующего красителя. Реакцию ферментации углеводов с образованием кислоты считали положительной при появлении покраснения среды. Все изученные штаммы показали отрицательную реакцию с ферментации углеводов с образованием кислоты (реакция с метил-рот) (рис.8).

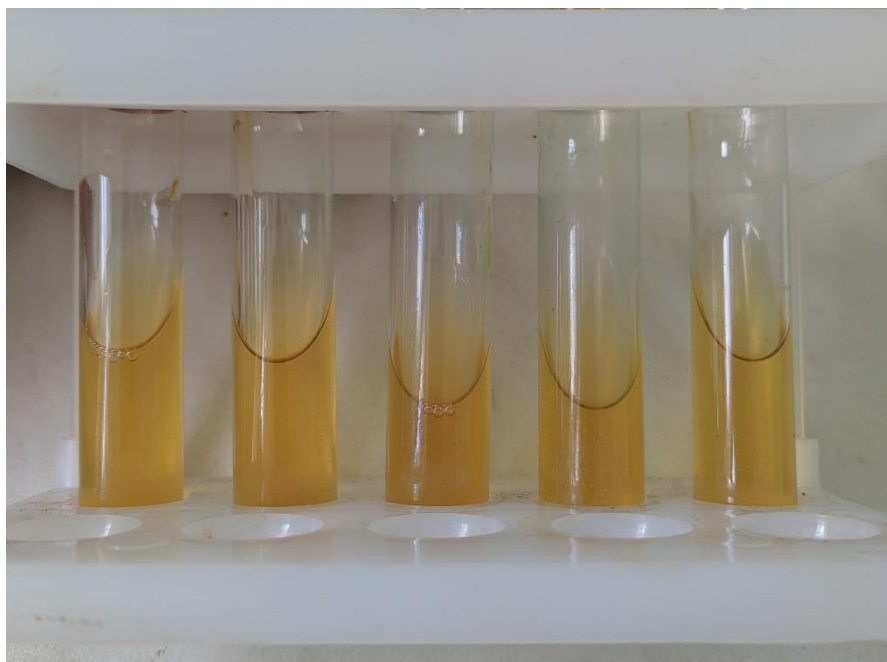


Рисунок 9. Тест на разжижение желатина (слева-направо В-570, В-610, В-611, Хсс 14-УГСХА, Хсс 17-УГСХА, 48ч, 28°C)

Тест на разжижение желатина проводили путем культивирования исследуемых бактерий на питательной среде, содержащей 15% желатина. Положительным результатом считали при разжижении среды. Все исследованные штаммы показали положительный результат теста на разжижение желатина (рис.9).

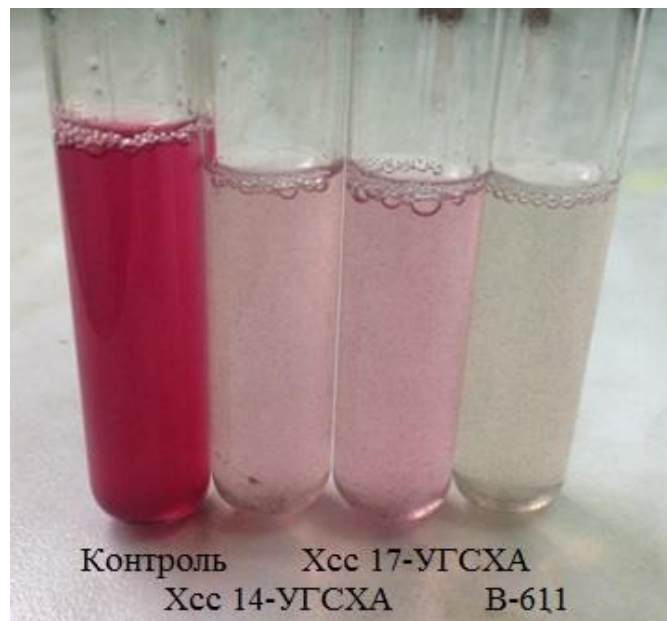


Рисунок 10. Определение способности восстановления нитратов (48ч, 28°C)

Нитратредуктазный тест проводили путем добавления к испытуемой культуре бактерий, выращиваемой на среде с нитратами, тест-реактива Грисса. При восстановлении бактериями нитратов до нитритов происходит окрашивание содержимого пробирки в красный цвет. В соответствии с полученными данными часть штаммов (Хсс 14-УГСХА, Хсс 17-УГСХА) показал спорный результат, поскольку произошло частичное окрашивание среды. Другие штаммы (В-570, В-610, В-611) показали строго отрицательный результат (рис. 10).



Рисунок 11. Изучение сахаролитических свойств на средах Гисса (на примере штамма В-570, 60ч, 28°C)

Изучение сахаролитических свойств изучаемых бактерий определяли по изменению цвета среды Гисса с соответствующим углеводом (рис.11)

Помимо этого, на заключительном этапе были проведены исследования на определение способности к росту изучаемых бактерий при различной концентрации NaCl, а также была определена потребность в факторах роста.

Патогенность референс-штаммов изучали на тест-культурах капусты, обладающих восприимчивостью к данному фитопатогену. Исследование проводили методом укола в сосудистую ткань растения стерильной иглой, смоченной в суспензии исследуемых бактерий (не менее 10^7 м.к./мл). Производили 3-4 укола на 1 лист, после чего растение инкубировали при температуре воздуха в помещении 21-24 °С в течение 12-15 суток. После проводили учет на наличие характерных симптомов на инокулированных листьях капусты. В качестве контроля иглу смачивали в стерильном физиологическом растворе.

Изучение биохимических свойств показало, что все изученные штаммы обладают способностью к образованию сероводорода, разжижают желатин, показали отрицательную реакцию с метил-рот и Фогес-Проскауэра, в разной степени гидролизуют казеин, способны расти при концентрации NaCl до 6%, нитрат не восстанавливают, ферментируют глюкозу и сахарозу, не ферментируют лактозу и сорбит, имеют потребность в факторах роста, не образуют индол. По показателю ферментации маннита, мальтозы, ксилозы получены расходящиеся данные. Так штамм В-570 не ферментировал маннит, штамм Хсс 14-УГСХА показал отрицательную реакцию с мальтозой, штамм Хсс 14-УГСХА имел отрицательный результат с ксилозой. Тест на патогенность показал положительный результат со всеми изученными штаммами.

В таблице 2 представлены результаты изучения свойств референс-штаммов бактерий *Xanthomonas campestris*.

Таблица 2 – Характеристика референс-штаммов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

| Название штамма | Биологические свойства | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------------|----------|----------|------------------------------|-------------|---------------------|---------------------------|--------------------|------------------|----------|---------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------|-------------|----------|---------|---------|---------|---------|--------------|----------|---|
| | Окраска по Граму | Каталаза | Оксидаза | Образование H ₂ S | Подвижность | Реакция с метил-рот | Реакция Фогеса-Проскауэра | Образование индола | Гидролиз казеина | крахмала | Разжижение желатина | Рост в присутствии NaCl | Потребность в факторах роста | Восстановление нитрата | Ферментация | | | | | | Патогенность | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | глюкозы | сахарозы | лактозы | маннита | сорбита | ксилозы | | мальтозы | |
| В-570 | - | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | До 6% | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | |
| В-610 | - | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | До 6% | + | - | + | + | - | + | - | + | + | + | + |
| В-611 | - | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | До 6% | + | - | + | + | - | + | - | + | + | + | + |
| Хсс 14-УГСХА | - | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | До 6% | + | +/- | + | + | - | + | - | + | - | + | + |
| Хсс 17-УГСХА | - | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | До 6% | + | +/- | + | + | - | + | - | - | + | + | + |

«+» - реакция положительная, «-» - реакция отрицательная

Из таблицы 2 видно, что по большинству биологических свойств изученные референс-штаммы аналогичны данным, приведенным в научных публикациях [35, 66, 67, 79-81] и представленным в таблице 1. Заметим, что все изученные культуры проявляли сахоролитические свойства в среднем через 120 часов культивирования. При этом с некоторыми из представленных источников углевода реакция изученных культур протекала очень слабо, что проявлялось в незначительном изменении цвета среды Гисса. Таким образом, считаем, что полученные данные могут быть использованы для разработки бактериальной схемы выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

2.2.2. Разработка схемы выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* из объектов окружающей среды и изучение их биологических свойств

На основе полученных данных по референс-штаммам была разработана бактериологическая схема выделения и ускоренной идентификации бактерий *X. campestris*, включающая морфологические и биохимические признаки, которая представлена на рисунке 12.

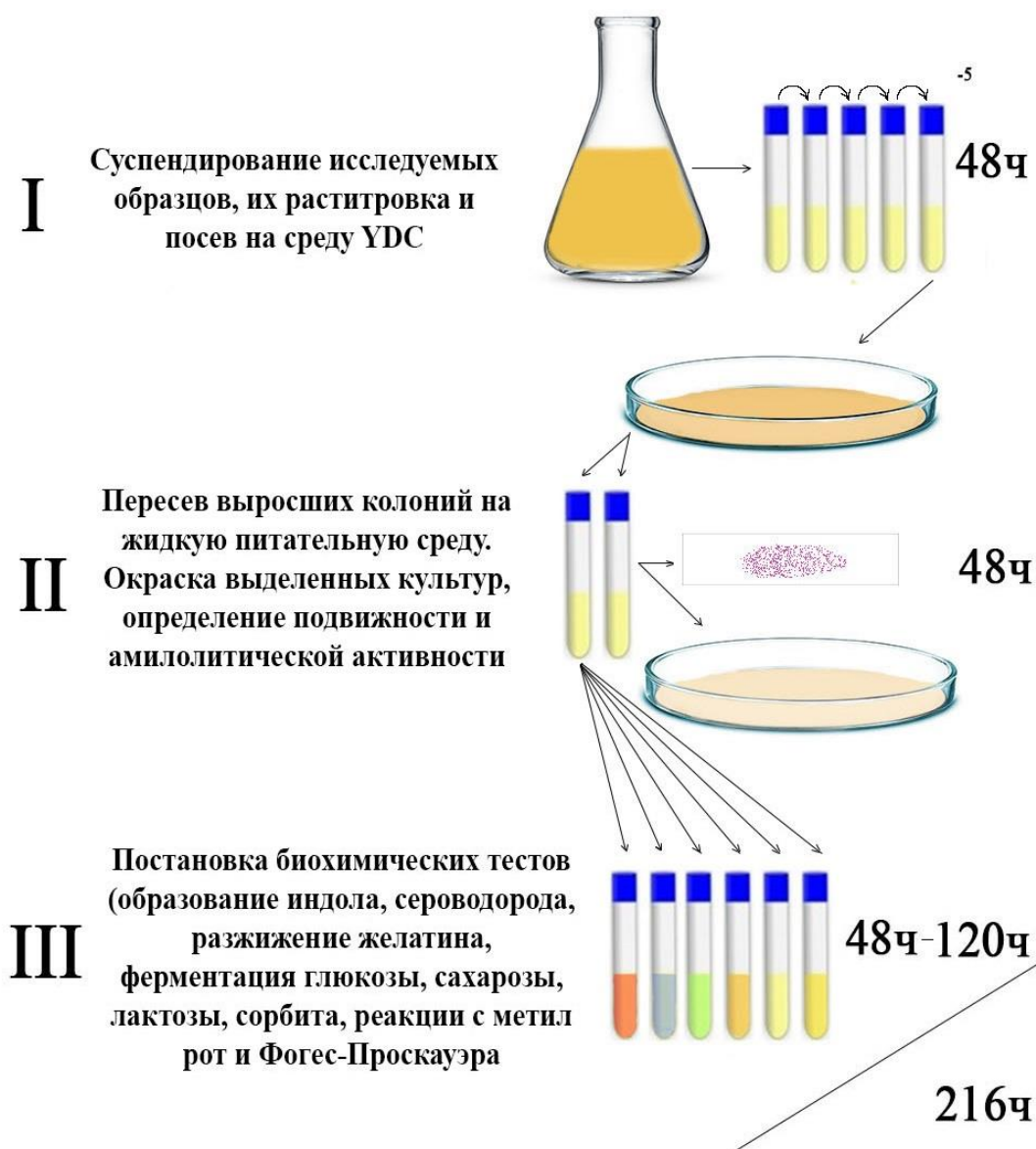


Рисунок 12. Схема выделения и идентификации бактерий *X. campestris*

В качестве критериев отбора тестов для бактериологической схемы были:

- доступность реактивов;

- время получения результатов;
- максимальное соответствие результата теста между штаммами.

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 амилалитической активности. Проводится изучение ферментативной активности. Результат II этапа – выделение грамотрицательных бактерий, подвижных и проявляющих амилалитическую активность, каталазоположительность, оксидазоотрицательность.

III. На третьем этапе идет изучение таких биохимических показателей искомым бактерий, как образование индола, интенсивность кислотообразования (реакция с метил-рот), продукция ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра) 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, отрицательная реакция с метил-рот и продукции ацетоина, 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 pv. campestris* из отобранных пораженных частей капусты и образцов почвы. В период с 2018 по 2019 год было происследовано на наличие бактерий *X. campestris pv. campestris* 74 образца капусты с признаками поражения сосудистым бактериозом, полученных с фермерских и лично-подсобных хозяйств Ульяновской области и 41 образец почвы с мест выращивания капустных культур Ульяновской области.

Выделение бактерий *X. campestris pv. campestris* проводили из пораженных сельскохозяйственных культур семейства Капустные и образцов почвы, для чего в соответствии с представленной ранее методикой готовили суспензию из указанных материалов и физиологического раствора. Затем проводили титрование полученной суспензии до 5 разведений и осуществляли посев на среду YDC. Инкубировали посеvy при +28°C в течении 48 часов. Первичную идентификацию бактерий вида *X. campestris pv. campestris* проводили визуально по наличию колоний с желтым пигментом (рис. 13).

В таблице 3 приведен полный список выделенных штаммов бактериальных культур, соответствующих по морфологии бактериям *Xanthomonas campestris pv. campestris*.



Рисунок 13. Рост выделенных бактерий *X. campestris pv. campestris* на среде YDC (48ч, 28°C)

Таблица 3 – Выделенные из исследуемых образцов культуры бактерий

| № п.п | Номер штамма | Объект выделения штамма | Место получения пробы |
|-------|--------------|---|---|
| 1. | К1 | Кочан капусты | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 2. | Кл1 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 3. | Кл2 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 4. | К2 | Кочан капусты | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 5. | П1 | Образец почвы | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 6. | Кл3 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 7. | П2 | Образец почвы | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 8. | П3 | Образец почвы | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 9. | К3 | Кочан капусты | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 10. | Кл4 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 11. | Кл5 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 12. | Кл6 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 13. | Кл7 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 14. | Кл8 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 15. | Кл9 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 16. | К4 | Кочан капусты | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 17. | К5 | Кочан капусты | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 18. | П4 | Образец почвы | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 19. | Кл10 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |

Продолжение таблицы 3

| | | | |
|-----|------|---|---|
| 20. | Кл11 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 21. | Кл12 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 22. | К6 | Кочан капусты | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 23. | К7 | Кочан капусты | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 24. | П5 | Образец почвы | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 25. | П6 | Образец почвы | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 26. | П7 | Образец почвы | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 27. | П8 | Образец почвы | Агрофирма, Старомайнский район, Ульяновская область |
| 28. | П9 | Образец почвы | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 29. | Кл13 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 30. | Кл14 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 31. | К8 | Кочан капусты | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 32. | Кл15 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 33. | Кл16 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 34. | Кл17 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |
| 35. | П10 | Образец почвы | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 36. | П11 | Образец почвы | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 37. | П12 | Образец почвы | Садовые участки, Чердаклинский район, Ульяновская область |
| 38. | Кл18 | Капустный лист с признаками поражения бактериозом | КФХ, Вешкаймский район, Ульяновская область |

Далее были изучены основные биологические свойства выделенных штаммов в соответствии с разработанной схемой выделения и идентификации бактерий *X. campestris pv. campestris*.

В таблице 4 представлена характеристика выделенных штаммов бактериальных культур, наиболее соответствующих по биологическим свойствам *X. campestris pv. campestris*.

Таблица 4. Характеристика свойств выделенных бактерий

| Обозначение штамма | Биологические свойства | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------------------------|------------------------------|-------------|---------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------|---------|---------|---------|
| | Окраска по Граму | Образование H ₂ S | Подвижность | Реакция Фогеса-Проскауэра | Образование индола | Разжижение желатина | Реакция с метил-рот | Гидролиз крахмала | Ферментация | | | |
| | | | | | | | | | сахарозы | глюкозы | сорбита | лактозы |
| П1 (Хс1-УлГАУ) | - | + | + | - | - | + | - | + | + | + | - | - |
| Кл4 (Хс2-УлГАУ) | - | + | + | - | - | + | - | + | + | + | - | - |
| Кл9 (Хс9-УлГАУ) | - | + | + | - | - | + | - | + | + | + | - | - |
| Кл12 (Хс12-УлГАУ) | - | + | + | - | - | + | - | + | + | + | - | - |
| П4 (Хс18-УлГАУ) | - | + | + | - | - | + | - | + | + | + | - | - |
| К2 (Хс22-УлГАУ) | - | + | + | - | - | + | - | + | + | + | - | - |

«+» - реакция положительная, «-» - реакция отрицательная,

По результатам проведенных исследований было выделено 6 «полевых» штаммов бактерий *X. campestris pv. campestris* (Хс1-УлГАУ, Хс2-УлГАУ, Хс9-УлГАУ, Хс12-УлГАУ, Хс18-УлГАУ, Хс22-УлГАУ). Изучение биологических свойств показало, что все выделенные штаммы обладали типичными свойствами. Изученные штаммы представляют собой одиночными либо соединенными в небольшие цепочки бактерии с закругленными краями. Обладают подвижностью и окрашиваются отрицательно по Граму. Рост на питательных средах проявляют в виде круглых, гладких, блестящих колоний с ровным краем. Имеют желтый пигмент. По биохимическим свойствам все выделенные штаммы показали

отрицательную реакцию с метил-рот и Фогес-Проскауэра, обладали способностью к образованию сероводорода, разжижали желатин, ферментировали сахарозу и глюкозу. Изученные культуры не ферментировали лактозу и сорбит, не образовывали индол и гидролизировали крахмал.

Также были проведены исследования по изучению скорости роста выделенных бактерий и их титра в конкретных временных точках. Для этого в пробирки с 5 мл стерильной жидкой питательной средой LB добавляли по 0,1 мл каждой из представленных выше бактериальных культур в концентрации 10^6 м.к./мл. После чего посеы инкубировали при температуре 28 °С в течение 48 часов с фиксацией результатов каждые 6 часов. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5. Изменения титра бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* в зависимости от времени культивирования при температуре 28 °С

| Название штамма | Титр изучаемой бактериальной культуры, м.к./мл | | | | | | | | |
|-----------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Начало эксперимента | 6ч | 12ч | 18ч | 24ч | 30ч | 36ч | 42ч | 48ч |
| Хс1 | 2×10^4 | $1,2 \times 10^{5 \pm 0,1}$ | $1,8 \times 10^{6 \pm 0,1}$ | $1,6 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $2,5 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,6 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,7 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,7 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,5 \times 10^{8 \pm 0,1}$ |
| Хс2 | 2×10^4 | $1,7 \times 10^{5 \pm 0,1}$ | $1,4 \times 10^{6 \pm 0,1}$ | $1,3 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,6 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,8 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,9 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,9 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,7 \times 10^{8 \pm 0,1}$ |
| Хс9 | 2×10^4 | $1,1 \times 10^{5 \pm 0,1}$ | $1,5 \times 10^{5 \pm 0,1}$ | $1,2 \times 10^{6 \pm 0,1}$ | $1,6 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,7 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,9 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,0 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,2 \times 10^{8 \pm 0,1}$ |
| Хс12 | 2×10^4 | $1,3 \times 10^{5 \pm 0,1}$ | $1,5 \times 10^{6 \pm 0,1}$ | $1,1 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,5 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,6 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,8 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,1 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,2 \times 10^{8 \pm 0,1}$ |
| Хс18 | 2×10^4 | $1,1 \times 10^{5 \pm 0,1}$ | $1,5 \times 10^{5 \pm 0,1}$ | $1,4 \times 10^{6 \pm 0,1}$ | $1,7 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,1 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,9 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,2 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,4 \times 10^{8 \pm 0,1}$ |
| Хс22 | 2×10^4 | $1,0 \times 10^{5 \pm 0,1}$ | $1,2 \times 10^{6 \pm 0,1}$ | $1,7 \times 10^{6 \pm 0,1}$ | $1,5 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,7 \times 10^{7 \pm 0,1}$ | $1,0 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,3 \times 10^{8 \pm 0,1}$ | $1,8 \times 10^{7 \pm 0,1}$ |

Так, по данным таблицы 5 видно, что абсолютно все выделенные штаммы достигают концентрации в 10^8 спустя 42 часа культивирования. Но

при этом титр отдельных бактериальных культур превышал 10^8 уже спустя 24 часа (Хс1, Хс2). По отдельным штаммам также была выявлена тенденция к снижению концентрации бактерий спустя 48 часов культивирования (Хс2, Хс12).

Таким образом, установлено, что наиболее оптимальное время культивирования бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* составляет 24 часа, что обусловлено достижением концентрации 10^7 - 10^8 м.к./мл. Культивирование сверх установленного времени позволяло добиться положительного результата в концентрации бактериальных клеток, однако результат не сопоставлялся с затрачиваемым на культивирование временем, в связи с чем было решено отказаться от культивирования бактериальных культур на протяжении более 24 часов.

Была изучена убойчивость бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* к воздействию температуры и трихлорментана для дальнейшего выделения бакериофага и очистки исследуемого субстрата от живых клеток бактерий. Для этих целей провели изучение устойчивости бактерий к температуре в диапазоне температур 56-68 °С и трихлорметану в концентрации 1:5, 1:10 и 1:20. Все представленные параметры подбирались опытным путем. В качестве бактериальных тест-культур использовали штаммы бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс1, Хс2, Хс9, Хс12, Хс18, Хс22, а также имеющиеся референс-штаммы (В-570, В-610, В-611, Хсс 14-УГСХА, Хсс 17-УГСХА).

Для изучения устойчивости бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* к температуре пробирки с суспензией бактериальных культур в концентрации 10^7 - 10^8 м.к./мл прогревали на водяной бане при температуре 56-68 °С с шагом в 2 °С в течение 10-30 минут с шагом в 10 минут. После чего производили бактериальный посев на чашки Петри и в течение 48 часов фиксировали рост или отсутствие роста исследуемых штаммов. Результаты исследований представлены в таблицах 6-8 и на рисунке 14.

Таблица 6. Устойчивость бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* к температуре (время экспозиции 10 минут)

| Температура \ Штамм | 56 °C | 58 °C | 60 °C | 62 °C | 64 °C | 66 °C | 68 °C |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Хс1 | + | + | + | + | + | + | + |
| Хс2 | + | + | + | + | + | + | + |
| Хс9 | + | + | + | + | + | + | + |
| Хс12 | + | + | + | + | + | + | - |
| Хс18 | + | + | + | + | + | - | - |
| Хс22 | + | + | + | + | + | + | - |
| В-570 | + | + | + | + | + | + | + |
| В-610 | + | + | + | + | + | + | - |
| В-611 | + | + | + | + | + | + | + |
| Хсс 14-УГСХА | + | + | + | + | + | + | - |
| Хсс 17-УГСХА | + | + | + | + | + | + | + |

Таблица 7. Устойчивость бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* к температуре (время экспозиции 20 минут)

| Температура \ Штамм | 56 °C | 58 °C | 60 °C | 62 °C | 64 °C | 66 °C | 68 °C |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Хс1 | + | + | + | - | - | - | - |
| Хс2 | + | + | + | - | - | - | - |
| Хс9 | + | + | + | - | - | - | - |
| Хс12 | + | + | - | - | - | - | - |
| Хс18 | + | + | - | - | - | - | - |
| Хс22 | + | + | + | - | - | - | - |
| В-570 | + | + | - | - | - | - | - |
| В-610 | + | + | + | - | - | - | - |
| В-611 | + | + | + | - | - | - | - |
| Хсс 14-УГСХА | + | + | - | - | - | - | - |
| Хсс 17-УГСХА | + | + | + | - | - | - | - |

Полученные данные свидетельствуют о том, что при прогревании бактериальных культур в течение 10 минут все исследуемые штаммы показали устойчивость к температуре (в диапазоне температур 56-66 °C) в

данном промежутке времени, а также некоторые штаммы показали устойчивость и свыше 68 °С (табл.6).

При прогревании в течение 20 минут большинство штаммов показали устойчивость к температуре вплоть до 62 °С (рис.14), при этом штаммы Хс12, Хс18, В-570, Хсс 14-УГСХА оказались не устойчивы к температуре 60 °С (табл.7).

Таблица 8. Устойчивость бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* к температуре (время экспозиции 30 минут)

| Температура \ Штамм | 56 °С | 58 °С | 60 °С | 62 °С | 64 °С | 66 °С | 68 °С |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Хс1 | + | - | - | - | - | - | - |
| Хс2 | + | - | - | - | - | - | - |
| Хс9 | + | + | - | - | - | - | - |
| Хс12 | - | - | - | - | - | - | - |
| Хс18 | - | - | - | - | - | - | - |
| Хс22 | + | - | - | - | - | - | - |
| В-570 | + | - | - | - | - | - | - |
| В-610 | + | - | - | - | - | - | - |
| В-611 | + | - | - | - | - | - | - |
| Хсс 14-УГСХА | + | - | - | - | - | - | - |
| Хсс 17-УГСХА | - | - | - | - | - | - | - |

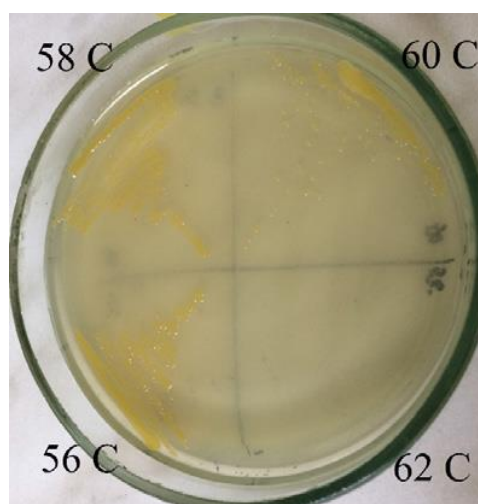


Рисунок 14. Рост бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Хс2 после прогревания в течение 20 минут (среда LB, 48ч, 28°С)

При времени экспозиции равному 30 минутам большинство изученных штаммов (кроме Хс12, Хс18, Хсс 17-УГСХА) показали устойчивость к температуре 56 °С (табл.8). Таким образом, считаем оптимальной для инактивации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* температуру 62 °С при времени экспозиции 20 минут. От прогревания в течение 30 минут было принято решение отказаться, поскольку при снижении температуры с 62 до 56 градусов, при которой достигается инактивация живых бактериальных клеток, время постановки эксперимента увеличивается в 1,5 раза (с 20 до 30 минут). Прогревание в течение 10 минут при изученных параметрах температуры показало свою неэффективность, что обусловлено невозможностью инактивировать живые клетки бактерий большинства изученных штаммов при заданных параметрах. В связи с этим от данной временной экспозиции также было принято решение отказаться.

Таблица 9. Устойчивость бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* к трихлорметану в зависимости от концентрации и времени экспозиции

| Штамм | Концентрация 1/5 | | | Концентрация 1/10 | | | Концентрация 1/20 | | |
|--------------|------------------|--------|--------|-------------------|--------|--------|-------------------|--------|--------|
| | 10 мин | 20 мин | 30 мин | 10 мин | 20 мин | 30 мин | 10 мин | 20 мин | 30 мин |
| Хс1 | + | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Хс2 | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Хс9 | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Хс12 | + | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Хс18 | + | - | - | + | - | - | + | - | - |
| Хс22 | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| В-570 | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| В-610 | + | + | - | + | - | - | - | - | - |
| В-611 | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Хсс 14-УГСХА | + | + | - | + | - | - | + | - | - |
| Хсс 17-УГСХА | + | + | - | + | - | - | + | - | - |

Изучение устойчивости бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* к трихлорметану проводили следующим путем. В пробирки с суспензией бактериальных культур в концентрации 10^7 - 10^8 м.к./мл добавляли трихлорметан в концентрации 1/5, 1/10 или 1/20, после чего активно

встряхивали в пробирку в течение 5, 15 и 25 минут и давали отстояться в течение 5 минут. Общее время экспозиции в 3-х экспериментах составило соответственно 10, 20 и 30 минут. По окончании времени экспозиции отбирали надосадочную жидкость и производили посев на чашки Петри. Посевы культивировали при температуре 28°C в течение 48 часов. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 9.

Изучаемые бактерии проявили устойчивость к воздействию трихлорметана в концентрации 1/5 в течение 20 минут, в концентрации 1/10 в течение 10 минут и в концентрации 1/20 в течение 10 минут. Считаем, что оптимальными параметрами времени проведения эксперимента и количества затрачиваемых реактивов являются время экспозиции 20 минут и концентрации трихлорметан 1/10.

Хранение бактериальных культур проводится на полужидкой питательной среде LB, с содержанием 0,3% бактериологического агара, при температуре 2-4 °С. Пересев осуществляется ежеквартально.

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

Для выделения бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* использовали все выделенные ранее штаммы бактерий (Хс1, Хс2, Хс9, Хс12, Хс18, Хс22), а также имеющиеся референс-штаммы (В-570, В-610, В-611, Хсс 14-УГСХА, Хсс 17-УГСХА).

Первый этап наших исследований был посвящен выделению бактериофагов из культур бактерий под действием на них индуцирующего фактора, в частности использовались ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), источником которых служила ртутная газоразрядная лампа, при уровне излучаемой энергии в виде УФ-лучей не менее 90% с длиной волны в пределах 250-260 нм [164]. В данном эксперименте использовали культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста (6 часов). Готовили разведение культур бактерий в фосфатном буфере (рН 7,4) в соотношении 1:20 и по 10 мл разливали в две чашки Петри для каждой повторности. После чего одну из чашек (опытную) открывали и в течении 20 (30, 40, 60) секунд облучали в зоне действия УФ-лучей на расстоянии 40 (50, 60) см, оставшуюся чашку выдерживали в зоне действия ультрафиолетовых лучей закрытой при тех же параметрах облучения. Эксперимент проводили в затемненном помещении без доступа солнечных лучей с целью предохранения культур микроорганизмов, подвергшихся облучению, от фотореактивации.

Затем взвеси бактерий (3-4 мл) засекали в отдельные пробирки с 5 мл питательной среды LB и инкубировали 24 часа в термостате при 28 °С.

Параллельно осуществляли посев методом агаровых слоев с использованием одной из бактериальных культур *Xanthomonas campestris pv. campestris* и инкубировали при 28 °С в течении 24 часов. Литический эффект действия определяли в первом случае по просветлению среды в пробирке с взвесью бактерий из открытой чашки, во втором случае по появлению негативных колоний на среде. Схема эксперимента представлена на рисунке 15.

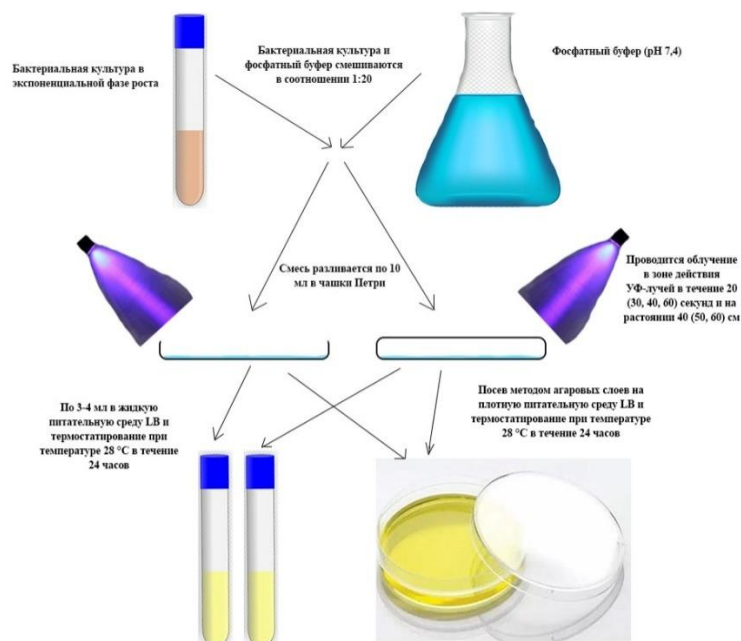


Рисунок 15. Схема выделения бактериофагов из культур бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* путем воздействия на них индуцирующего фактора (УФ-лучи)

По истечению времени инкубирования в обеих пробирках наблюдалось помутнение среды, на чашках Петри отсутствовали прозрачные бляшки, что свидетельствовало об отсутствии бактериофага в исследуемой суспензии.

Кроме того, проводилось выделение профага из бактериальных клеток воздействием на них химического фактора, индуцирующего механизм репликации фаговой ДНК, в качестве которого использовался митомицин С в дозе 0,5 мкг/мл. Для этого в пробирки с жидкой питательной средой LB, содержащей 0,5 мкг/мл митомицина С, засевали исследуемые культуры. Пробирки культивировали в течении 5-6 часов при 28 °C. После этого содержимое пробирок центрифугировали при 3000 об/мин в течении 20 минут, после чего фильтровали через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм. Наличие бактериофагов изучали методом «стекающая капля», для чего на поверхность плотной питательной среды YDC наносили несколько капель суточной культуры бактерий *X. campestris pv. campestris*, далее стерильным шпателем растирали капли по поверхности среды и

термостатировали при 28 °С в течении 20-30 минут с целью подсушивания «газона». Затем наносили каплю исследуемого фильтрата на поверхность среды и наклоняли чашку Петри. После чего чашки термостатировали при 28 °С в течении 48 часов. Наличие зон лизиса свидетельствовало о присутствии бактериофага в исследуемом фильтрате. Схема эксперимента представлена на рисунке 16.

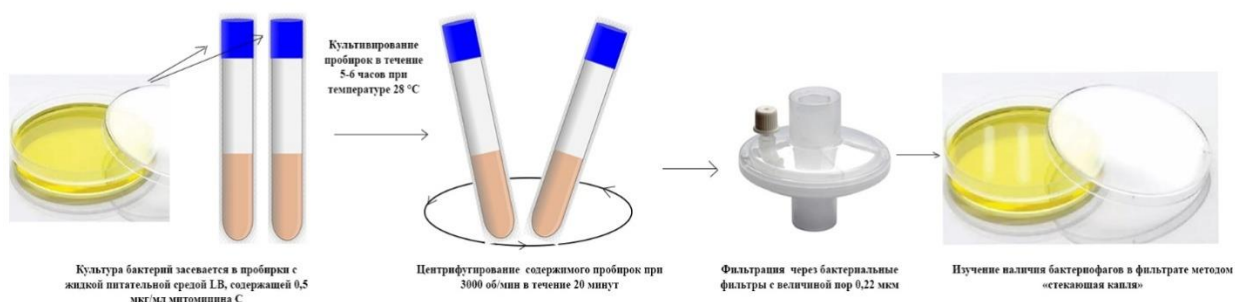


Рисунок 16. Схема выделения бактериофагов из культур бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* путем воздействия на них индуцирующего фактора (митомицин С)

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 методикам, опробированным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ [178, 179].

Выделение бактериофагов из объектов внешней среды проводили путем суспендирования 10 г исследуемого материала, в качестве которого использовались образцы почвы и/или среза растений с признаками сосудистого бактериоза, в 50 мл жидкой питательной среды LB. Затем в получившуюся суспензию добавляли по 2 мл 24-часовых культур бактерий

Xanthomonas campestris pv. campestris и культивировали при 28 °С в течении суток.

Далее очищали исследуемый субстрат от механических примесей путем фильтрования через ватный фильтр, разливали в центрифужные пробирки и центрифугировали при 3000 об в течении 30 мин. После отбирали надосадочную жидкость и очищали путем фильтрации через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм. Полученные суспензии исследовали на наличие в них бактериофагов методом «стекающая капля» (рис. 17). Для этого на поверхность плотной питательной среды LB наносили несколько капель изучаемой культуры бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*, далее стерильным шпателем растирали капли по поверхности среды и термостатировали при 28 °С в течении 20-30 минут с целью подсушивания «газона». Затем наносили каплю исследуемого фильтрата на поверхность среды и наклоняли чашку Петри. После чего чашки термостатировали при 28 °С в течении 48 часов.

Применение плотной питательной среды LB в отличие от плотной питательной среды YDC было обусловлено большей прозрачностью среды и наглядности получения негативных колоний. О наличии в фильтрате бактериофагов судили по появлению зоны лизиса на газоне культуры.

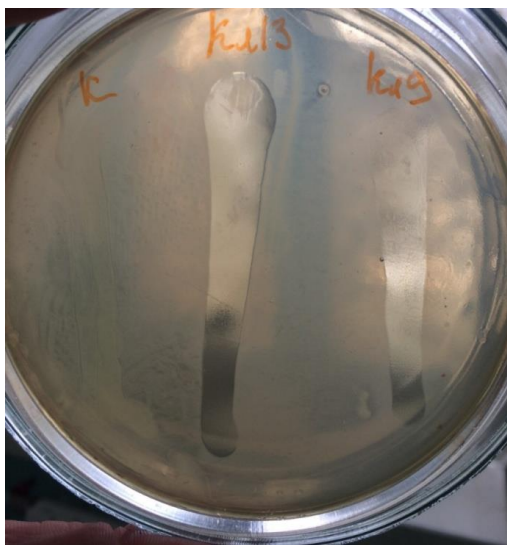


Рисунок 17. Зоны лизиса на газоне культуры *Xanthomonas campestris pv. campestris* В-570 (LB, 28 °С, 48 ч)

Установлено, что существенное влияние на лизис бактериальных клеток оказывал состав питательной среды. Так плотные питательные среды, содержащие источник углеводов (YDC), показали большую устойчивость к действию бактериофагов (рис. 18), о чем свидетельствовало более слабое проявление негативных колоний, их меньший размер (в среднем на 0,2-0,4 мм) и более низкую литическую активность (в среднем на $1,1 \times 10^5$ БОЕ/мл). Данный факт на наш взгляд обусловлен образованием бактериями *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* экзополисахаридов в присутствии источника углеводов, которые повышали устойчивость данных бактерий к внешнему воздействию.

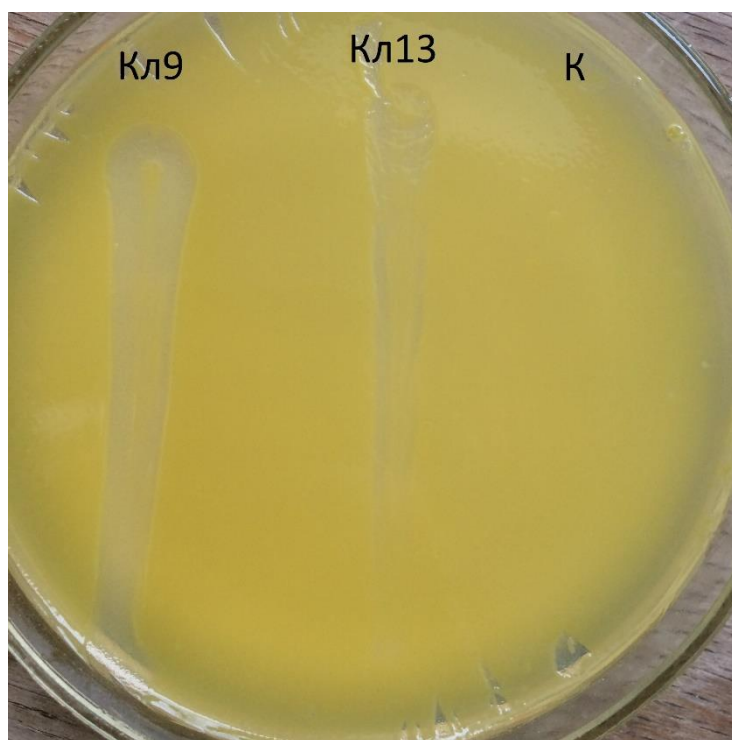


Рисунок 18. Зоны лизиса на газоне культуры *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Xcc 14-УГСХА (YDC, 28 °C, 48 ч)

Помимо этого, был проведен ряд экспериментов по выявлению бактериофагов в образцах пораженных растений и почвы без предварительного культивирования в присутствии бактерий *X. campestris* pv. *campestris* и очистки субстрата. Для этого 10 г исследуемого материала суспендировали в 50 мл физиологического раствора, оставляли суспензию на 20-30 минут при комнатной температуре и затем исследовали наличие

бактериофагов в полученных суспензиях методом «агаровых слоев». В 2,5 мл полужидкой среды LB (0,7%) добавляли 0,1 мл суточной культуры *X. campestris pv. campestris* Xc2 0,5 мл исследуемого субстрата. Затем получившуюся суспензию выливали на поверхность плотной питательной среды LB и культивировали при 28 °С в течении 24 часов. О наличии бактериофагов судили по появлению прозрачных зон лизиса на поверхности среды (рис. 19).

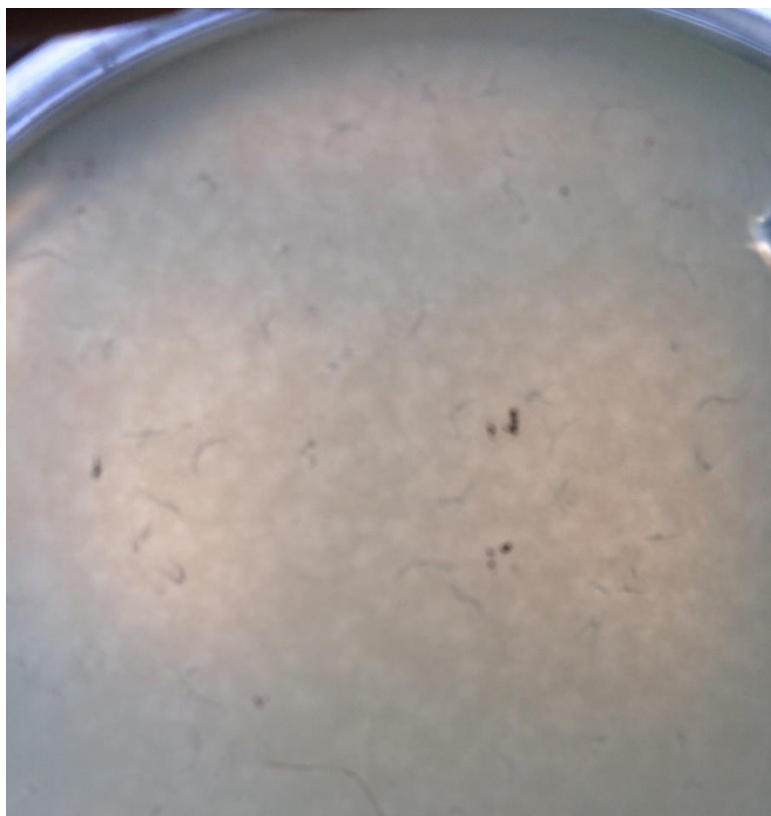


Рисунок 19. Зоны лизиса методом агаровых слоев (LB, 28 °С, 24 ч)

Полученные результаты показали возможность применения использованного метода для выявления бактериофагов в образцах почвы растений, однако наличие в образцах сопутствующей микрофлоры затрудняло обнаружение действия бактериофагов. В связи с этим было принято решение дополнительно к данному методу применять метод очистки суспензии от бактериальных клеток.

На основе результатов проведенных исследований была разработана схема выделения бактериофагов *X. campestris pv. campestris*, которая

представлена на рисунке 20. В качестве основных критериев при разработке данной схемы выступали:

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



Рисунок 20. Схема выделения бактериофагов *X. campestris pv. campestris*

На первом этапе проводится приготвлении 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 предварительная 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 обработка суспензии 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% питательной среды LB предварительно расплавленного и остуженного до 45°C добавляется 1 мл исследуемого фильтрата и 1-2 капли суточной культуры бактерий *X. campestris pv. campestris*. Полученная суспензия выливается на поверхность плотной питательной среды LB. После этого чашки со средой культивируют при 28 °C в течении 24 +/- 1 часов. Наличие бактериофагов определяют по образованию зон лизиса на поверхности плотной питательной среды LB.

После выделения проводили селекцию бактериофагов с целью повышения их литической активности путем десятикратного пассирования бактериофага на имеющихся культурах бактерий *X. campestris pv. campestris* [161].

Пассирование бактериофагов проводили по следующей схеме: в пробирку с 4,5 мл жидкой питательной среды LB вносили 0,2 мл исследуемого бактериофага и 0,2 мл восприимчивой культуры бактерий *X. campestris pv. campestris*. После проводили инкубирование посевов в течение 24 часов при температуре 28 °C. По прошествию заданного времени содержимое пробирок с бактериофагом фильтровали с применением мембранных фильтров фирмы Millipore (0,22 мкм). Далее проводили очередной пассаж путем внесения 0,2 мл полученного фильтрата и 0,2 мл свежей культуры бактерий *X. campestris pv. campestris* в пробирку, содержащую 4,5 мл жидкой питательной среды LB. Для получения наилучшего эффекта проводили не менее 7 пассажей бактериофага. В качестве контроля служила пробирка с 4,5 мл жидкой питательной среды LB,

к которой добавили 0,2 мл восприимчивой культуры бактерий и 0,2 мл стерильной питательной среды вместе исследуемого бактериофага.

Таблица 10. Источники выделения бактериофагов

| Обозначение бактериофага | Источник выделения |
|--------------------------|---|
| Кл9-УлГАУ | Листья капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область, Старомайнский район |
| Кл13-УлГАУ | Сосудистая система капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область, Старомайнский район |
| Кл20-УлГАУ | Листья капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область, Ульяновский район |
| Кл21-УлГАУ | Сосудистая система капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область, Ульяновский район |
| Кл22-УлГАУ | Сосудистая система капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область, Павловский район |
| 32-УлГАУ | Образец почвы, Ульяновская область, Старомайнский район |
| 34-УлГАУ | Образец почвы, Ульяновская область, Старомайнский район |
| 37-УлГАУ | Образец почвы, Ульяновская область, Старомайнский район |
| Кл33-УлГАУ | Листья капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область, Павловский район |
| Кл34-УлГАУ | Сосудистая система капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область, Чердаклинский район |
| С4-УлГАУ | Образец почвы, Ульяновская область, Ульяновский район |

Всего по итогам проведенных исследований из 41 пробы почвы и 74 проб растений было выделено 10 бактериофагов. Результаты проведенных опытов представлены в таблице 10. Так основным источником выделения бактериофагов стали образцы, полученные с сельскохозяйственных предприятия Старомайнского района Ульяновской области, специализирующихся на выращивание овощей, в том числе Капустных 5 из 10 выделенных штаммов бактериофагов).

2.2.4. Изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris*

С целью отбора бактериофагов с наилучшими характеристиками было проведено изучение их основных биологических свойств, к которым относятся следующие:

- морфология негативных колоний;
- специфичность;
- литическая активность;
- спектр литического действия.

Изучение морфологии негативных колоний выделенных бактериофагов проводили на плотных питательных средах LB и YDC, для чего бактериофаги высевались методом агаровых слоев 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) (табл. 5). В соответствии с полученными данными все выделенные бактериофаги образуют небольшие однотипные, прозрачные негативные колонии округлой или неправильной формы (рисунки 21-22). Размер в диаметре составлял 0,5-3 мм. Отметим, что рост негативных колоний, выделенных бактериофагов на питательной среде, содержащей источник углеводов (YDC), проявлялся в виде небольших углублений. Данное явление, по нашему мнению, обусловлено выделением бактериями большого количества экзополисахарида на питательных средах, содержащих источник углеводов, что проявляется в обильном росте слизистой бактериальной массы, что является характерным для бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Отметим, что здесь и далее в качестве основной плотной питательной среды использовалась среда LB, поскольку, в отличие от плотной питательной среды YDC, которая при застывании в чашке Петри имеет беловато-кремовый цвет в следствии присутствия в составе карбоната кальция, данная среда после

застывания остается прозрачной. Данный факт упрощает работу с бактериофагами, в частности при подсчете БОЕ.

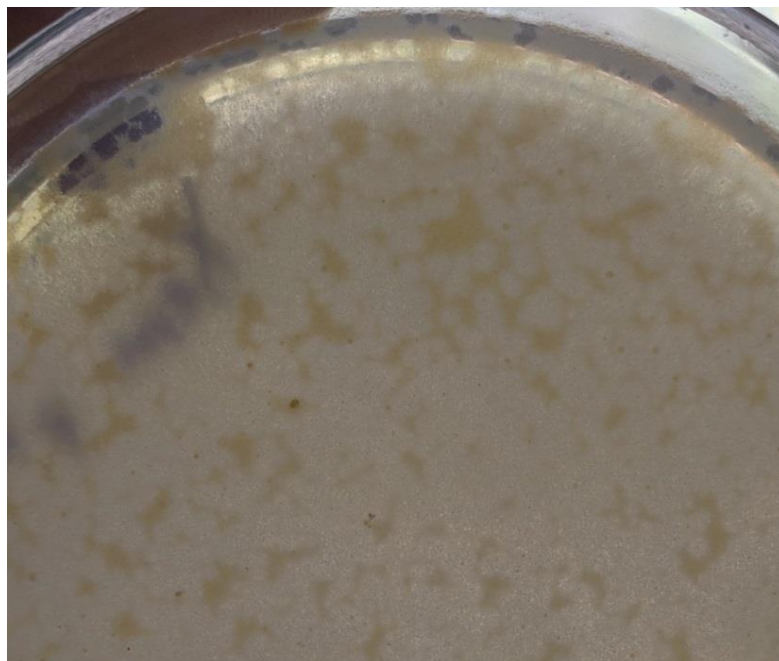


Рисунок 21. Морфология негативных колоний бактериофага Кл9-УлГАУ на среде LB (*X.campestris* Хс2, 24ч, 28 °С)



Рисунок 22. Морфология негативных колоний бактериофага Кл34-УлГАУ на среде YDC (*X.campestris* Хс2, 24ч, 28 °С)

Изучение специфичности бактериофагов является важным критерием для их применения в составе биопрепарата для последующего применения при индикации и идентификации бактерий, поскольку от этого напрямую зависит точность проводимых исследований. Для изучения специфичности выделенных бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* использовали штаммы бактерий гомологичного рода (*Xanthomonas arboricola*, *Xanthomonas oryzae*, *Xanthomonas euvesicatoria*). Помимо этого, в исследовании использовали ряд других бактерий-возбудителей болезней растений (*Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae*). Данные бактерий были выбраны, поскольку являются фитопатогенными бактериями. Специфичность исследуемых бактериофагов определяли по их способности лизировать культуры *Xanthomonas campestris pv. campestris* и по отсутствию лизиса на других культурах.

Изучение специфичности проводили методом «стекающей капли», для чего на заранее подготовленные чашки Петри с плотной средой LB наносили газон следующих видов бактерий *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas oryzae*. Газон культур подсушивали в термостате в течение 15-20 минут при 28 °С. Далее чашки Петри с газоном условно делили на два опытных и один контрольный секторы. На опытные секторы наносили несколько капель исследуемого бактериофага *Xanthomonas campestris pv. campestris*, на контрольный – несколько капель стерильной жидкой питательной среды LB. Посевы инкубировали в течение 24 часов при 28 °С. Полученные результаты представлены на рисунке 23 и в таблице 11.

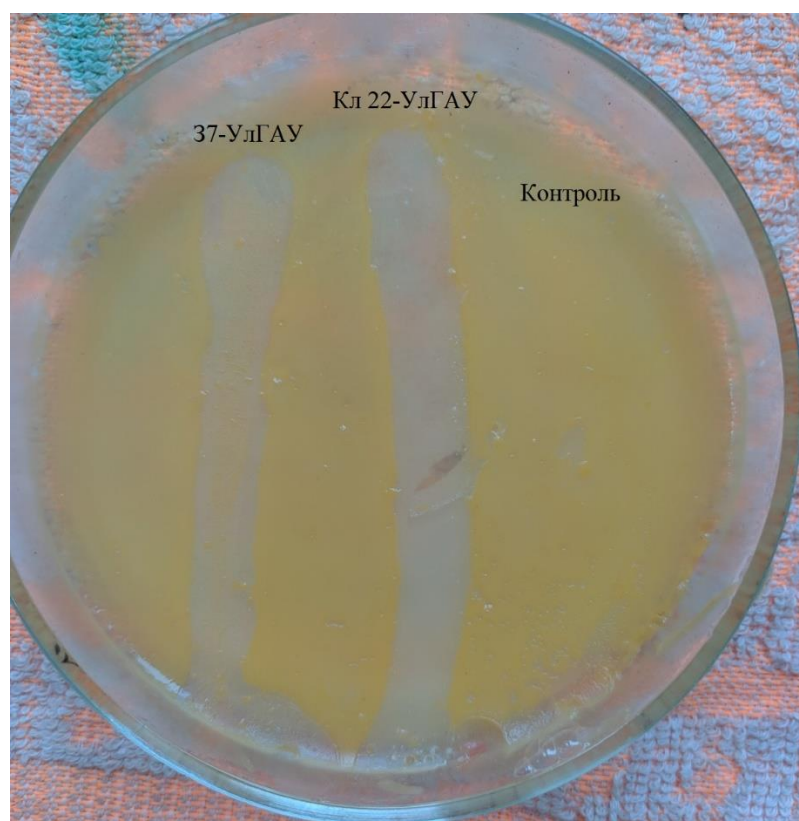


Рисунок 23 – Зона лизиса на *X.campestris* Хс2 при взаимодействии с фагами Кл 22-УЛГАУ и 37-УЛГАУ (28°C, 24ч)

Таблица 11. Специфичность бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* серии УЛГАУ

| Бактериофаг | Кл9 | Кл13 | Кл20 | Кл21 | Кл22 | 32 | 34 | 37 | Кл33 | Кл34 | С4 |
|--|-----|------|------|------|------|----|----|----|------|------|----|
| Культура | | | | | | | | | | | |
| <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Xanthomonas arboricola</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

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* Xc2, выращивали на жидкой среде LB в течение 24 часов. Учет результатов проводили спустя 24 часа культивирования посевов в термостате при 28 °С. Результаты проведенных исследований представлены на рисунках 24 и 25.



Рисунок 24. Изучение литической активности бактериофага Кл34-УлГАУ методом Аппельмана (*X.campestris* Xc2, 24ч, 28 °С)



Рисунок 25. Изучение литической активности бактериофага Кл34-УлГАУ методом Грациа (*X.campestris* Xc2, 24ч, 28 °С)

Кроме того, одной из важнейших характеристик выделенных бактериофагов является спектр литической активности в пределах конкретного вида. Изучение спектра литического действия выделенных бактериофагов проводили с использованием 11 штаммов бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*, выделенных нами из образцов почвы и пораженных растений, а также полученных из музея кафедры. Исследования проводили нанесением исследуемого бактериофага на газоны бактериальных культур методом спот-теста (рис. 26).

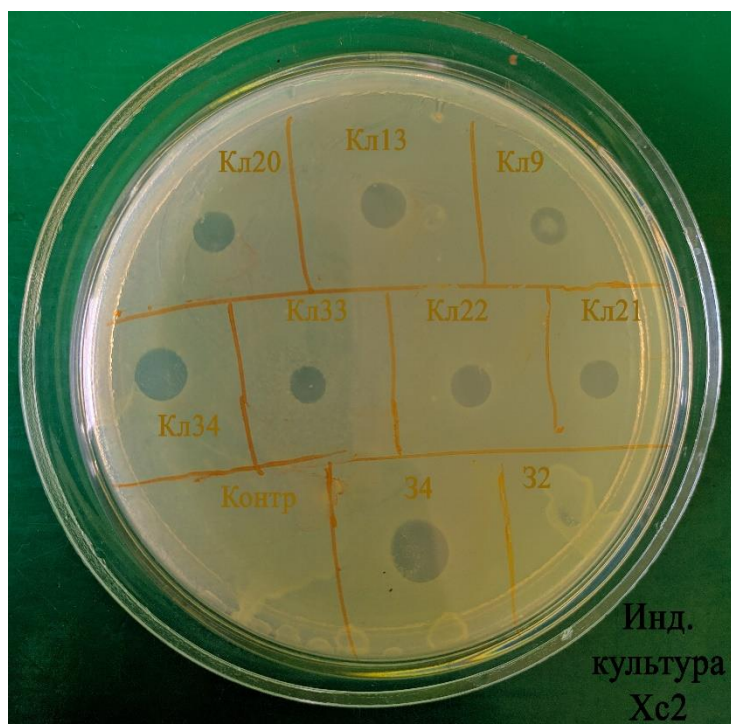


Рисунок 26. Спот-тест выделенных бактериофагов на индикаторной культуре *X.campestris* Xc2 (24ч, 28 °С)

В таблице 12 и на рисунке 27 приведены результаты исследования литической активности выделенных бактериофагов в отношении отдельных штаммов бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Исследования были проведены с целью возможности дальнейшего сравнения влияния отдельных методов инактивации живых бактерий на литическую активность бактериофагов. Поскольку отдельные штаммы бактерий не лизируются некоторыми бактериофагами было принято решение ограничить количество используемых в дальнейшем исследовании штаммов бактерий.

Таблица 12. Спектр литического действия выделенных бактериофагов

| Название бактериофага | Штаммы бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------------|--------------|
| | Хс1 | Хс2 | Хс9 | Хс12 | Хс18 | Хс22 | В-570 | В-610 | В-611 | Хсс 14-УГСХА | Хсс 17-УГСХА |
| Кл9-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | л | нл | л | нл | л |
| Кл13-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | л | л | л | л | л |
| Кл20-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | л | нл | нл | нл | л |
| Кл21-УлГАУ | л | л | л | л | нл | л | л | нл | нл | нл | л |
| Кл22-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | л | л | л | л | л |
| 32-УлГАУ | л | л | л | л | нл | нл | нл | нл | нл | л | л |
| 34-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | нл | нл | л | л | нл |
| 37-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | л | нл | л | л | нл |
| Кл33-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | нл | нл | нл | л | л |
| Кл34-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | л | л | л | л | л |
| С4-УлГАУ | л | л | л | л | л | л | нл | нл | нл | нл | нл |

Примечание: л – лизис культуры бактерий, нл – отсутствие лизиса

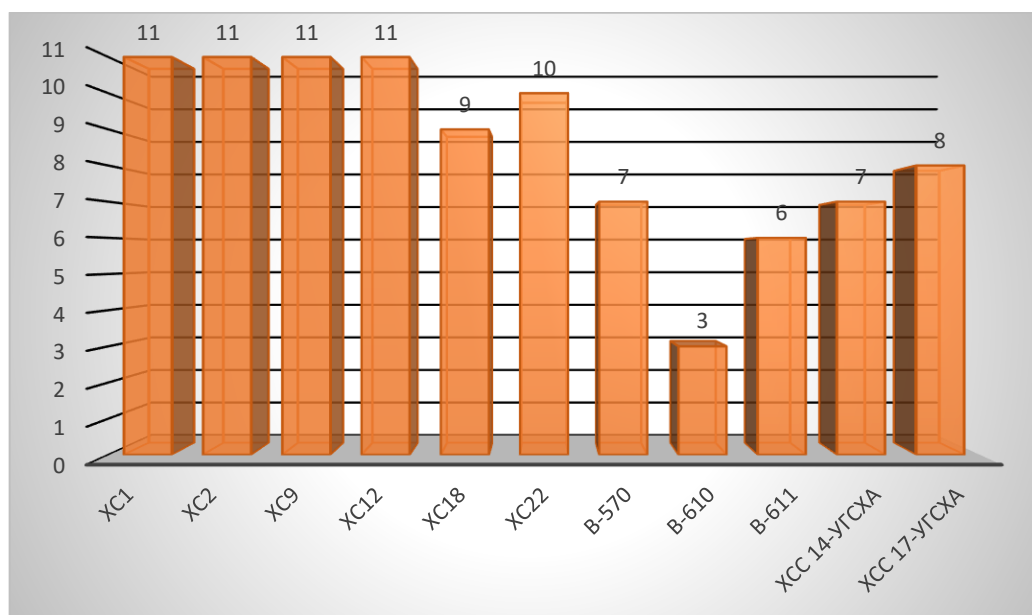


Рисунок 27. Количество бактериофагов, вызывающих лизис конкретного штамма

Экспериментальным путем был установлен различный уровень литической активности и различный диапазон действия в отношении 11

изученным штаммам *Xanthomonas campestris pv. campestris* изученных бактериофагов (табл. 13).

Таблица 13. 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 ($1,6 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$) и обладающий наиболее широким среди изученных бактериофагов спектром литического действия (96,9% изученных бактериальных культур).

Хранение бактериофагов производят с производственным штаммом бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 на жидкой питательной среде LB, при температуре 2-4 °С. Ежеквартально проводится пересев бактериофагов. Перед пересевом производится их пассирование по ранее описанной методике.

Сроки годности бактериофагов определяли путем изучения показателя литической активности при хранении при температуре 2-4 °С. Установлено, что изучаемые бактериофаги сохраняли литическую активность по Аппельману, равную 10^7 - 10^8 БОЕ/мл в течение 12 месяцев.

2.2.5. 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.

Одним из основных этапов при производстве фагового биопрепарата является его очистка от живых клеток производственной культуры. Помимо воздействия самого метода очистки на литическую активность бактериофага, дополнительное влияние может оказать и бактериальная культура, на которой производилось наращивание бактериофага. В связи с этим, несмотря на то, что в качестве производственного штамма ранее был отмечен штамм *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2, как обладающий наибольшим показателем роста в течение 24 часов, для целей разработки биопрепарата считаем необходимым изучение воздействия способов очистки бактериофага на всех имеющихся культурах бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*

Для подбора наилучшего метода очистки бактериофага от производственной культуры с целью конструирования биопрепарата было проведено сравнительное изучение влияния описанных ранее методов инактивации бактерий (таблицы 6-9) на литическую активность бактериофагов в сравнении с методом фильтрации через мембранные фильтры с величиной пор 0,1 мкм и 0,22 мкм. Отметим, что от использования мембранных фильтров с величиной пор 0,45 мкм было принято решение отказаться, поскольку после фильтрации был отмечен рост бактериальной культуры.

Для проведения эксперимента в пробирку, содержащую 4,5 мл жидкой питательной среды LB, засекали исследуемый бактериофаг (0,2 мл) с исследуемым штаммом бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* (0,2

мл) и культивировали при температуре 28°C в течение 24 часов. После чего проводили обработку суспензии трихлорметаном и температурой, в соответствии с ранее полученными оптимальными параметрами и отдельно проводили фильтрацию изучаемой суспензии через мембранные фильтры с величиной пор 0,1 и 0,22 мкм. Далее определяли литическую активность изучаемого бактериофага методом агаровых слоев. Результаты проведенных опытов представлены в таблице 14 и на рисунке 28.

Таблица 14. 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) | 1,3x10 ⁷ ± 0,2x10 ⁷ | 1,5x10 ⁷ ± 0,2x10 ⁷ | 1,2x10 ⁷ ± 0,3x10 ⁷ | 3,7x10 ⁶ ± 0,1x10 ⁶ | 2,4x10 ⁶ ± 0,5x10 ⁶ | 1,5x10 ⁷ ± 0,1x10 ⁷ |
| Обработка температурой (62 °С, 20 мин) | 1,0x10 ⁷ ± 0,3x10 ⁷ | 1,2x10 ⁷ ± 0,1x10 ⁷ | 1,0x10 ⁷ ± 0,2x10 ⁷ | 2,2x10 ⁶ ± 0,1x10 ⁶ | 2,9x10 ⁶ ± 0,3x10 ⁶ | 2,6x10 ⁶ ± 0,2x10 ⁶ |
| Фильтрация (величина пор 0,1 мкм) | 1,4x10 ⁶ ± 0,3x10 ⁶ | 1,8x10 ⁶ ± 0,4x10 ⁶ | 1,2x10 ⁶ ± 0,1x10 ⁶ | 1,1x10 ⁶ ± 0,2x10 ⁶ | 1,8x10 ⁶ ± 0,3x10 ⁶ | 1,4x10 ⁶ ± 0,2x10 ⁶ |
| Фильтрация (величина пор 0,22 мкм) | 1,4x10 ⁸ ± 0,1x10 ⁸ | 2,2x10 ⁸ ± 0,1x10 ⁸ | 1,1x10 ⁸ ± 0,1x10 ⁸ | 1,5x10 ⁷ ± 0,2x10 ⁷ | 1,4x10 ⁷ ± 0,1x10 ⁷ | 1,3x10 ⁸ ± 0,1x10 ⁸ |
| Метод очистки | Штамм бактерий | | | | | |
| | В-570 | В-610 | В-611 | Хсс 14-УГСХА | Хсс 17-УГСХА | |
| Обработка трихлорметаном (1/10, 20 мин) | 3,8x10 ⁷ ±0,2 x10 ⁷ | 2,4x10 ⁷ ±0,2 x10 ⁷ | 4,2x10 ⁶ ±0,2 x10 ⁶ | 8,2x10 ⁶ ±0,2 x10 ⁶ | 4,4x10 ⁶ ±0,2 x10 ⁶ | |
| Обработка температурой (62 °С, 20 мин) | 1,5x10 ⁶ ±0,2 x10 ⁷ | 1,2x10 ⁷ ±0,1 x10 ⁷ | 3,8x10 ⁶ ±0,2 x10 ⁶ | 5,3x10 ⁵ ±0,3 x10 ⁵ | 1,8x10 ⁵ ±0,4 x10 ⁵ | |
| Фильтрация (величина пор 0,1 мкм) | 1,2x10 ⁷ ±0,3 x10 ⁷ | 9,8x10 ⁶ ±0,4 x10 ⁶ | 1,0x10 ⁵ ±0,1 x10 ⁵ | 2,5x10 ⁶ ±0,3 x10 ⁶ | 2,8x10 ⁵ ±0,5 x10 ⁵ | |
| Фильтрация (величина пор 0,22 мкм) | 1,1x10 ⁸ ±0,1 x10 ⁸ | 1,8x10 ⁸ ±0,1 x10 ⁸ | 5,2x10 ⁷ ±0,2 x10 ⁷ | 8,9x10 ⁷ ±0,5 x10 ⁷ | 3,3x10 ⁷ ±0,2 x10 ⁷ | |

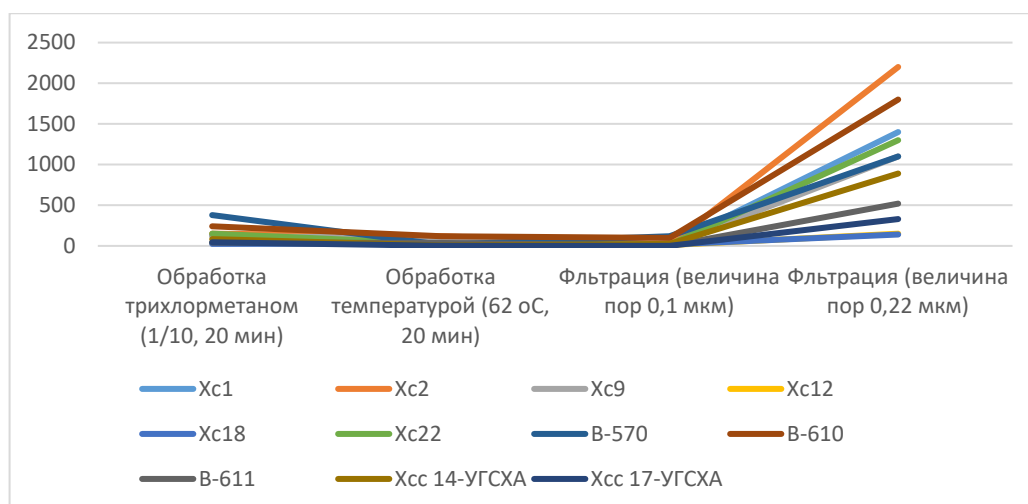


Рисунок 28. Литическая активность бактериофага КлЗ4-УлГАУ после очистки суспензии от бактерий различными методами (по правому столбцу количество БОЕ/мл уменьшенное в 10^5 раз)

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что наиболее предпочтительным методом очистки суспензии от бактериальных клеток является фильтрация через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм, поскольку это позволяет сохранить наивысший уровень литической активности. Так, при использовании фильтров с величиной пор 0,1 мкм, происходит значительное снижение (в отдельных случаях с 10^8 до 10^6 БОЕ/мл) литической активности исследуемого бактериофага. Возможно, причиной данного явления считаем более быстрое засорение пор, что в итоге приводило к снижению пропускной способности фильтров. Обработка температурой также оказала негативное влияние на литическую активность. Наиболее близкие к фильтрации (величина пор 0,22 мкм) показатели литической активности были зафиксированы после обработки суспензий трихлорметаном. В связи с этим в качестве наиболее приемлемого способа очистки суспензии от бактериальных клеток считаем фильтрацию с использованием мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм, которая позволила добиться наивысшего показателя литической активности исследуемых бактериофагов. Данный метод считаем оптимальным в качестве параметра изготовления фагового биопрепарата.

На основе представленных данных было принято решение при изготовлении индикаторного бактериофага для биопрепарата использовать штамм бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 (производственный). Данный штамм обладает наибольшим титром ($1,6 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ БОЕ/мл) при культивировании в течение 24 часов по сравнению с другими штаммами (таблица 5). Кроме того, данные в таблице 13 также свидетельствует о более высокой литической активности изучаемых бактериофагов при использовании штамма Хс2.

Следующий этап наших исследований был посвящен определению оптимального соотношения между активностью бактериофага и временем пассажа, для чего в пробирки с жидкой питательной средой LB в объеме 4,5 мл добавляли по 0,2 мл производственной культуры бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2 и 0,2 мл исследуемого бактериофага (всего 11 бактериофагов). Одновременно с этим ставились контрольные пробирки производственной культуры бактерий и отдельно бактериофага. Культивирование проводили в термостате при температуре 28 °С. Время экспозиции подбирали опытным путем начиная с середины экспоненциальной фазы роста бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2 ($8 \text{ч} \pm 0,3 \text{ч}$) с шагом в 4 ч. После культивирования полученные суспензии, содержащие бактериофаг, фильтровали с применением мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм и определяли литическую активность по методу Грациа. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Изменение титра бактериофага с увеличением 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 оптимальное время культивирования исследуемого бактериофага 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 эти оптимальным в качестве технологического параметра для изготовления фагового препарата считаем время пассажа 24 ч. Отметим, что при культивировании свыше 36 часов наблюдалось снижение литической активности исследуемого бактериофага.

Для определения количественного соотношения фага и производственной культуры в отдельные пробирки с жидкой питательной средой LB в объеме 4,5 мл вносили по 0,2 мл исследуемого бактериофага (всего 5 пробирок). После этого в пробирки вносили производственную культуру бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2 при концентрации 10^7 - 10^8 м.к./мл в объеме от 0,2 до 1 мл с шагом 0,2 мл (параметры подбирались экспериментальным путем). Параллельно с этим ставился контроль бактериофага и производственной культуры бактерий. Далее пробирки культивировали в термостате при температуре 28 °С в течение 24 часов. После культивирования содержимое пробирок фильтровали с применением мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм и определяли литическую активность по методу Грация (табл. 16).

Таблица 16 – Зависимость титра бактериофага от количества производственной культуры бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2

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

По результатам проведенных исследований установлено, что наиболее оптимальным соотношением фага и производственной культуры бактерий

для исследуемых бактериофагов являются 1:2 и 1:3 о чем свидетельствуют представленные в таблице 16 данные. При данных соотношениях фага и бактериальной культуры были получены очень близкие результаты. В качестве оптимального производственного параметра было выбрано соотношение фага и бактериальной культуры 1:2, поскольку при получении схожих результатов данное соотношение позволяет сэкономить затрачиваемые ресурсы (количество питательной среды).

В дальнейшем для определения оптимальных температурных показателей культивирования исследуемых бактериофагов в пробирки с жидкой питательной средой LB в объеме 4,5 мл отдельно вносили 0,2 мл исследуемого бактериофага и по 0,2 мл культуры бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2 в концентрации 10^7 - 10^8 м.к./мл. Параллельно с этим ставили контрольные пробы производственной культуры и отдельно каждого из бактериофагов. Посевы культивировали в термостате в течение суток при различных температурных режимах от 12 °С до 36 °С с шагом 4 °С (параметры подбирались экспериментально). Результаты проведенных исследований представлены в таблице 17. Наличие лизиса определяли по отсутствию помутнения среды с индикаторной культурой бактерий.

Таблица 17 – Оптимальные температурные показатели культивирования бактериофага Кл34-УлГАУ в течение 24 часов

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

Проведенные исследования показали, что диапазон оптимальной температуры культивирования исследуемого бактериофага находится в пределах 20–32°С. Отметим, что при культивировании образцов при температуре 12-16 °С видимого роста бактерий в исследуемых пробирках, также как и в контрольных не наблюдалось.

Таким образом ключевые технологические параметры изготовления биопрепарата на основе бактериофага КлЗ4-УлГАУ выглядят следующим образом (табл. 18).

Таблица 18 - Основные технологические параметры изготовления биопрепарата на основе бактериофага КлЗ4-УлГАУ

| Технологический параметр | Значение |
|--|--|
| Производственный штамм | <i>X. campestris pv. campestris</i> Хс2 |
| Очистка бактериофага от бактериальных клеток | С применением мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм |
| Оптимальное время культивирования | 24 часа |
| Оптимальное соотношение фаг/культура | 1:2 |
| Оптимальная температура культивирования | 28 °С |

Наилучшим методом очистки суспензии от бактериальных клеток является фильтрация через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм.

В качестве оптимального времени пассажа при изготовлении фагового препарата считаем 24 ч, поскольку установлено, что данный параметр отражает оптимальное соотношение полученного результата (литическая активность бактериофага) и затраченного времени на культивирование.

В качестве оптимального соотношения фага и бактериальной культуры принято соотношение 1:2, поскольку при данном параметре получено наилучшее соотношение титра бактериофага к затрачиваемым на проведение опыта ресурсам.

Оптимальной температурой культивирования бактериофага считаем температуру 28 °С, поскольку при данном параметре сохраняется активность бактериофага, что доказано проведенными исследованиями, а также данная температура является оптимальной для роста бактерий *X. campestris pv. campestris*, в том числе производственного штамма Хс2.

Приведенные технологические параметры считаем оптимальными для изготовления фагового биопрепарата *X. campestris pv. campestris*.

2.2.6. Технология изготовления и контроля биопрепарата на основе бактериофага *Xanthomonas campestris pv. campestris* КлЗ4-УлГАУ

Изготовление биопрепарата проводится путем культивирования бактериофага КлЗ4-УлГАУ на жидкой питательной среде LB с производственной культурой *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 по технологическим параметрам, определенным ранее (табл. 18). В общем виде технология изготовления и контроля фагового биопрепарата представлена на рисунке 29.

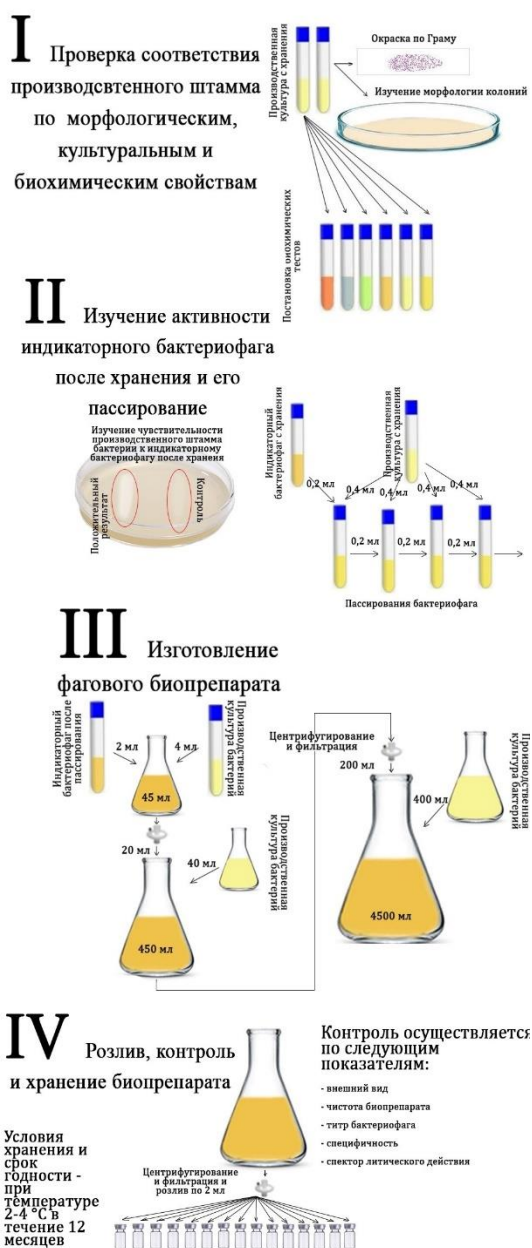


Рисунок 29 - Технология изготовления и контроля фагового биопрепарата

КлЗ4-УлГАУ

Перед началом изготовления проверяется соответствии производственного штамма бактериям *Xanthomonas campestris pv. campestris* по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам и отвечать следующим требованиям: представляет собой прямые палочки, подвижные, грамотрицательные, проявляющие амилолитическую активность, не образуют индола и продукции ацетоина, проявляют отрицательную реакцию с метил-рот, разжижают желатин, выделяют сероводород, ферментируют глюкозу и сахарозу и не ферментируют лактозу и сорбит.

Изучается активность индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ после хранения к производственному штамму *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 для чего на чашки с плотной питательной средой LB и засеянной газонем производственной культурой бактерий наносят 1-2 капли бактериофага. Параллельно наносится 1-2 капли стерильного бактериологического бульона в качестве контроля. Далее чашки наклоняют на 40-45° для распределения капель по площади секторов и термостатируют при температуре 28°C в течение 24 часов. Чувствительность производственного штамма к фагу определяют по проявлению зоны лизиса в секторе с бактериофагом и ее отсутствию в контрольном образце. Далее проводится пассирование индикаторного бактериофага по ранее описанной схеме. Проводится 4-7 пассажей бактериофага в зависимости от активности индикаторного бактериофага после хранения.

Далее, исходя из представленных ранее параметров, изготовление и масштабирование 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°C.

Положительный результат учитывают при визуальном осмотре – питательная среда в колбе с бактериофагом должна оставаться прозрачной, в контрольной пробирке наблюдается помутнение среды, что свидетельствует о росте бактериальной культуры. 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 посева. 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 посева. 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 окончании наработки бактериофагов производится их контроль, для чего отбирается проба в объеме 40-50 мл. 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.

Розлив фагового биопрепарата производится в стерильные флаконы объемом 2 мл. На каждый флакон с биопрепаратом наклеивается этикетка, содержащая наименование, адрес производства, титра бактериофага, номер серии и срока годности и условия хранения. После этого флаконы группируются по 10 штук в картонную упаковку, к которой дополнительно прикладывается инструкция по применению биопрепарата.

Дополнительно для оценки качества розлитого биопрепарата и его стерильности производится отбор не менее 10 случайных флаконов из одной партии. На основе 5 флаконов проводится анализ чистоты, внешнего вида, титра бактериофага, специфичности и спектра литического действия. Оставшиеся 5 флаконов находятся в архиве не менее 18 месяцев.

Хранение биопрепарата производят при температуре 2-4 °С. Срок годности биопрепарата на основе бактериофага Кл34-УлГАУ определяли путем изучения показателя литической активности при хранении при температуре 2-4 °С. Установлено, что сконструированный биопрепарат сохранял литическую активность, равную 10^7 - 10^8 БОЕ/мл в течение 12 месяцев.

2.2.7. Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага

Подбор оптимальных параметров для постановки реакции нарастания титра фага и отработку ее количественных показателей, которые имеют диагностическое значение, провели экспериментальным путем с использованием 24 часовой культуры *X. campestris pv. campestris* Хс2 в концентрации от 10^3 до 10^8 м.к./мл, инкубируемой при температуре 28 ± 1 °С на жидкой питательной среде LB. В качестве контроля использовалась интактная жидкая питательная среда LB.

В соответствии с литературными данными оптимальная рабочая концентрация бактериофага при постановке РНФ должна составлять 10^2 - 10^5 БОЕ/мл [151, 162-164, 166]. Исходя из этого изначально проводили разведение бактериофага, с учетом того, что начальная концентрация бактериофага в биопрепарате составляла 10^8 БОЕ/мл. Схема проведения разведений бактериофага представлена на рисунке 30.

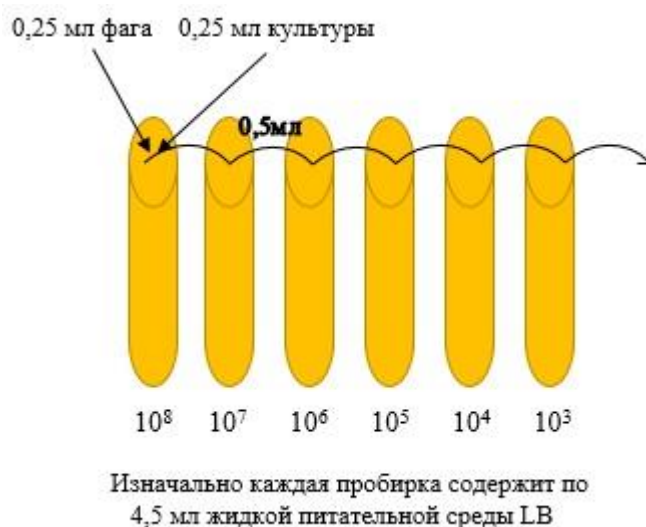


Рисунок 30 – Схема разведения бактериофага

Методика эксперимента заключалась в следующем. В 5 опытных колб, содержащих по 50 мл жидкой питательной среды LB вносили культуру бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2 в конечной концентрации 10^3 – 10^8 м.к./мл. Содержимое колб при этом встряхивали в течение 10 минут для лучшего распределения бактериальной массы в питательной среде.

В качестве параметров времени экспозиции, температуры культивирования и соотношения фаг/культура использовали данные, полученные при определении основных технологических параметров изготовления фагового биопрепарата.

Отдельные параметры постановки реакции нарастания титра фага с использованием разработанного биопрепарата *X. campestris pv. campestris* отрабатывали в соответствии с методиками, предложенными и апробированными сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ [21, 161, 163, 179].

Для определения оптимального времени экспозиции проводили эксперименты в соответствии с представленными ниже параметрами:

- отсутствие предварительного культивирования изучаемого материала, термостатирование посевов после добавления бактериофагов в течение 6, 12, 18, 24 часов при температуре 28 ± 1 °С;
- предварительное культивирование изучаемого материала в течение 6 часов при температуре 28 ± 1 °С, термостатирование посевов после добавления бактериофагов в течение 6, 12, 18, 24 часов при температуре 28 ± 1 °С;
- предварительное культивирование изучаемого материала в течение 15 часов при температуре 28 ± 1 °С, термостатирование посевов после добавления бактериофагов в течение 6, 12, 18, 24 часов при температуре 28 ± 1 °С;
- предварительное культивирование изучаемого материала в течение 24 часов при температуре 28 ± 1 °С, термостатирование посевов после добавления бактериофагов в течение 6, 12, 18, 24 часов при температуре 28 ± 1 °С;

По завершению подготовки материала для экспериментов, в соответствии с ранее названными параметрами, проводили исследования по следующему алгоритму:

1. подготовка 4 пробирок (диаметр 10 мм) для опытной и контрольной проб и их нумерация соответственно 1, 2, 3 и Контроль;

2. в пробирки 1 и 2 внесение 9 мл жидкой питательной среды LB с культурой бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2 в каждую, а в пробирки 3 и Контроль внесение 9 мл стерильной жидкой питательной среды LB;

3. в пробирки 1 и 3 добавление 1 мл индикаторного бактериофага в рабочем разведении (для каждого эксперимента использовался свой титр – 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 БОЕ/мл). В пробирки 2 и Контроль внесение 1 мл стерильной жидкой питательной среды LB, в качестве контроля присутствия и высвобождения свободного фага. По итогу пробирка 1 является опытной – содержат жидкую питательную среду LB, контаминированную бактериями *X. campestris pv. campestris* Хс2 с бактериофагом Кл34-УлГАУ. В пробирке 2 индикаторный бактериофаг Кл34-УлГАУ отсутствовал для контроля на наличие свободного фага в культуре бактерий. Пробирка 3 выполняет роль контрольной для определения титра бактериофага Кл34-УлГАУ. Пробирка 4 – контроль стерильности питательной среды;

4. посеvy термостатируются при температуре 28 ± 1 °C в течение 6, 12, 18 или 24 часов, в соответствии с заранее определенными параметрами эксперимента;

5. по итогам культивирования опытных пробирок проводится высеv содержимого каждой на заранее подготовленные чашки Петри с плотной питательной средой LB по методу Грация. При необходимости проводили разведение содержимого опытных пробирок жидкой питательной средой LB в таком соотношении, чтобы, при осуществлении посева 1 мл содержимого из пробирки 3, на чашках образовывалось только несколько десятков негативных колоний бактериофага. С опытными пробирками 1 и 2 проводили аналогичные действия в том соотношении, которое было выбрано для

содержимого пробирки 3. Контроль за стерильностью питательной среды в пробирке Контроль проводили визуально. Помутнение в данной пробирке означает нарушение чистоты эксперимента.

б. проводится определение числа БОЕ в содержимом пробирок методом диффузии в агар по Грациа.

Оценку результатов исследований проводили на основе методики, многократно апробированной коллективом кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ [151, 162-164, 166]. Однако было принято решение модифицировать данную методику, поскольку даже незначительное изменение титра индикаторного бактериофага в сторону увеличения в опытной пробе по сравнению с контрольной будет свидетельствовать о присутствии в пробе индицируемой культуры, то было принято решение считать оценку положительной при увеличении количества БОЕ индикаторного бактериофага в опытной пробе по сравнению с контрольной в 2 и более раза. Оценку при увеличении количества БОЕ индикаторного бактериофага в опытной пробе по сравнению с контрольной менее чем в 2 раза предложено считать слабо положительной, поскольку есть необходимость учета возможной погрешности получаемых результатов. Модифицированная методика оценки РНФ представлена в таблице 19.

Таблица 19. Модифицированная оценка реакции нарастания титра фага

| Увеличение количества БОЕ индикаторного бактериофага в опытной пробе по отношению к количеству БОЕ в контрольной пробе | Оценка |
|--|---------------------|
| Отсутствие увеличения | Отрицательная |
| Увеличение менее, чем в 2 раза | Слабо положительная |
| Увеличение в 2 и более раза | Положительная |

В ходе проведенных экспериментов выхода свободного фага не было обнаружено ни в одном из опытов. Отметим, что в большинстве случаев при культивировании посевов в течение 6 и 12 часов наблюдалась отрицательная

либо слабо положительная чувствительность РНФ, о чем свидетельствовало увеличение количества БОЕ бактериофага Кл34-УлГАУ менее чем в 2 раз.

Кроме того, по результатам проведенных экспериментов было принято отказаться в дальнейшем от использования индикаторной культуры *X. campestris pv. campestris* Хс2 в концентрации ниже 10^7 м.к./мл. Это связано с отсутствием образования газона культуры при низких концентрациях бактерий и невозможности подсчета негативных колоний.

В таблице 20 представлены результаты изучения чувствительности РНФ при культивировании в течение 18 часов без предварительного культивирования при начальной концентрации бактериофага 10^4 БОЕ/мл.

Таблица 20 – Результаты РНФ при культивировании в течение 18 часов без предварительного культивирования (бактериофаг Кл34-УлГАУ 10^4 БОЕ/мл)

| Концентрации объекта исследования (контаминированная бактериями <i>X. campestris pv. campestris</i> Хс2 среда LB), м.к./мл | Контроль индикаторного фага, БОЕ/мл | Контроль свободного фага, БОЕ/мл | Опыт, БОЕ/мл | Увеличение (раз) |
|--|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|------------------|
| 10^7 | 14 ± 1 | - | 31±1 | 2,21 |
| 10^8 | | - | 36±1 | 2,57 |

По результатам проведенных исследований было установлено, что количественный показатель бактериофага Кл34-УлГАУ в опытной пробе был более чем в 2 раз выше количественного показателя бактериофага Кл34-УлГАУ в контрольной пробе при начальной концентрации бактериальной массы *X. campestris pv. campestris* Хс2 в жидкой питательной среде LB 10^7 - 10^8 м.к./мл. В соответствии с ранее установленными критериями оценки реакции нарастания титра фага, данные показатели являются можно считать диагностическими.

Поскольку при выделении бактерий из объектов внешней среды не всегда удается получить их концентрацию в количестве не менее 10^7 м.к./мл, остается необходимость их индикации при более низкой концентрации. Нами

предложено использовать полученные результаты с низкими концентрациями индикаторной культуры (менее 10^7 м.к./мл) в качестве дополнительной количественной методики определения степени увеличения количества БОЕ диагностического бактериофага в опытных пробах. Суть предлагаемой методики сводится к тому, что вместо подсчета негативных колоний на газоне бактериальной культуры, производится подсчет количества отдельно выросших колоний индикаторной культуры. В качестве положительной динамики увеличения количества БОЕ диагностического бактериофага свидетельствует снижение количества отдельно выросших колоний бактерий по сравнению с контрольным образцом. Данная методика может быть эффективно применена в тех случаях, когда начальная концентрация бактерий в исследуемом образце является недостаточной для образования сплошного газона бактериальной культуры.

Таблица 21. Изменение количества отдельных выросших колоний при концентрации бактериофага 10^4 БОЕ/мл в течение 24 часов без предварительного культивирования

| Концентрации объекта исследования (контаминированная бактериями <i>X. campestris pv. campestris</i> Xc2 среда LB), м.к./мл | Контроль индикаторного фага | Опыт | Уменьшение (раз) |
|---|--|------|------------------|
| | Количество колоний индикаторного штамма, м.к./мл | | |
| 10^5 | 153±1 | 47±1 | 3,26 |
| 10^4 | 122±1 | 35±1 | 3,49 |
| 10^3 | 98±1 | 24±1 | 4,08 |
| 10^2 | 77±1 | 17±1 | 4,52 |

При определении степени увеличения количества БОЕ диагностического бактериофага в опытных пробах по предложенной методике на основе подсчета количества выросших отдельных колоний бактерий было получено, что при даже самых низких концентрациях бактериофага (10^2 БОЕ/мл) происходит снижение количества выросших

отдельных колоний индикаторной культуры *X. campestris pv. campestris* Хс2 минимум в 2 раза по сравнению с контрольным образцом. Обобщенные данные приведены в таблице 21 и на рисунке 31.



Рисунок 31. Изменение количества отдельных выросших колоний при концентрации бактериофага 10^4 БОЕ/мл в течение 18 часов без предварительного культивирования (28 °С)

Несмотря на отсутствие образования газона культуры и невозможность подсчета негативных колоний бактериофага, возможен количественный учет отдельно выросших колоний бактерий, снижение которых в опытной пробе по сравнению с контрольной свидетельствует о положительной работе диагностического бактериофага. Исходя из данных, представленных в таблице 21, видно, что уменьшение колоний индикаторного штамма *X. campestris pv. campestris* Хс2 в опытной пробе по сравнению с контрольной произошло минимум в 3 раза.

В соответствии с полученными данными предварительное культивирование индикаторной бактериальной культуры в течение 6, 15 и 24 ч в большинстве случаев не давало ощутимого результата, который повлиял бы положительно на конечный результат, при этом увеличивалось общее время экспозиции. Кроме того, в отдельных случаях при дополнительном подрачивании культуры наблюдалось снижение чувствительности РНФ.

Обобщенные результаты чувствительности РНФ при времени культивирования 24 часа приведены в таблице 22.

Таблица 22. Чувствительность РНФ при различных параметрах (время культивирования посевов 18 часов)

| Концентрация индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ | Концентрация индикаторной культуры <i>X. campestris pv. campestris</i> Хс2, м.к./мл | | | | | | | |
|--|---|---|----|----|-----------------|---|----|----|
| | 10 ⁷ | | | | 10 ⁸ | | | |
| | Время предварительного культивирования индикаторной культуры, ч | | | | | | | |
| | 0 | 6 | 15 | 24 | 0 | 6 | 15 | 24 |
| 10 ² | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 ³ | + | - | - | - | + | - | - | - |
| 10 ⁴ | + | + | + | - | + | + | + | - |
| 10 ⁵ | л | + | - | - | + | + | - | - |

«+» - положительная чувствительность РНФ, «-» - отрицательная чувствительность РНФ, «л» - лизис

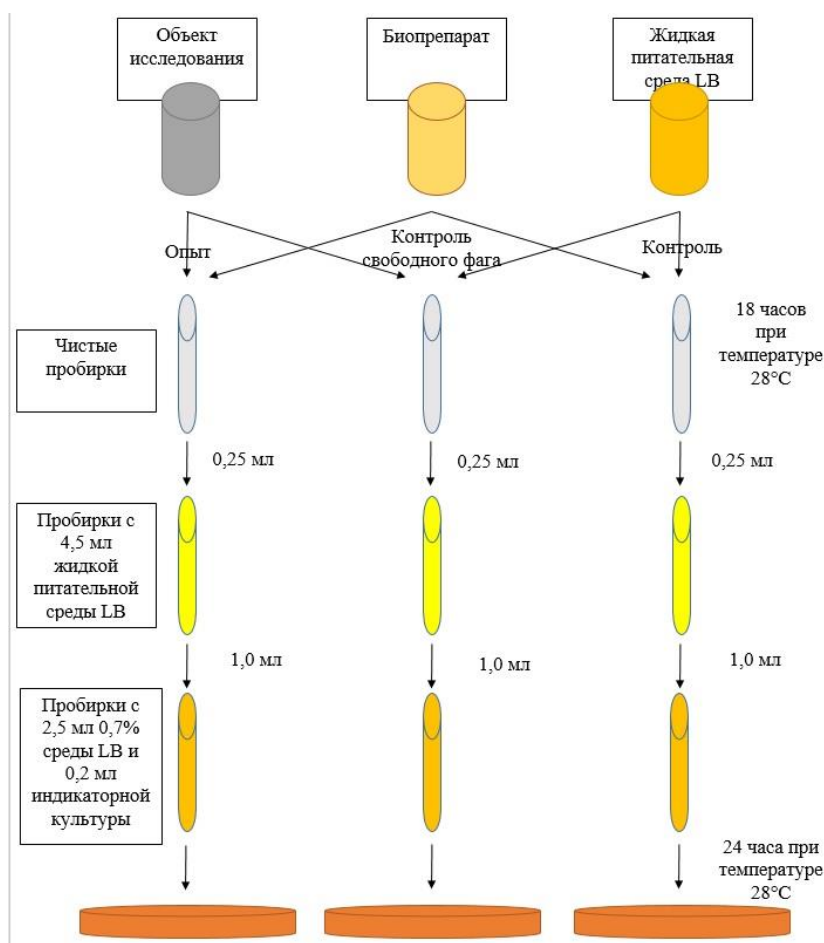


Рисунок 32 - Алгоритм постановки реакции нарастания титра фага с применением разработанного биопрепарата

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 - высев содержимого пробирок методом Грациа; 24 часа - культивирование на чашках Петри). На рисунке 32 представлена схема эксперимента.

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

Поскольку подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага проводился исключительно на жидкой питательной среде LB с использованием чистых культур бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*, возникает необходимость калибровки представленной ранее схемы (рис. 32) с целью ее оптимизации при использовании с различными объектами внешней среды (почва, вода, части растений, семенной материал).

Любой объект внешней среды будет иметь свой определенный химический состав и микрофлору, что может привести к ухудшению и недостоверности получаемых результатов. В связи с этим были проведены исследования по отработке реакции нарастания титра фага с нестерильными образцами почвы, воды, семенного и растительного материалов, которые были искусственно контаминированы бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* в концентрации 10^5 - 10^8 м.к./мл. Для этого исследуемые образцы (в каждом эксперименте использовали стерильный и нестерильный образец) в соотношении 1:10 вносили в колбы, содержащие по 100 мл жидкой питательной среды LB. После чего в колбы вносили индикаторный штамм *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 в концентрации 10^8 ; 10^7 ; 10^6 ; 10^5 м.к./мл (г). Полученные суспензии перемешивали, давали отстояться в течение 10 минут и затем исследовали в соответствии со схемой, представленной на рисунке 32.

В качестве рабочей концентрации использовали бактериофаг Кл34-УлГАУ в концентрациях 10^4 - 10^5 БОЕ/мл. Данные концентрации бактериофага были использованы в проведенных экспериментах, поскольку при этих значениях был получен наилучший результат постановки реакции нарастания титра фага при подборе параметров постановки РНФ (табл. 22).

На первом этапе проведенные опыты показали, что учет реакции нарастания титра фага затрудняется при подсчете негативных колоний в изначально нестерильных образцах, причиной чего является присутствие

других бактерий в образце либо в ухудшении образования газона индикаторной культуры микроорганизмов. В связи с этим перед разведением полученных субстратов предложена фильтрация опытных проб через фильтры с величиной пор 0,22 мкм непосредственно после культивирования в течении 18 часов.

Результаты проведенных исследований представлены в таблицах 23-30.

Таблица 23 – Результаты постановки РНФ (стерильная почва)

| Концентрация бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> (м.к./г) | Контроль индикаторного фага (10^4 БОЕ/мл) | Контроль индикаторного фага (10^5 БОЕ/мл) | Опыт (10^4 БОЕ/мл) | Опыт (10^5 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^4 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^5 БОЕ/мл) |
|--|--|--|-----------------------|-----------------------|--|--|
| | | | | | | |
| 10^5 | 12 ± 1 | 15 ± 1 | 19 ± 1 | 23 ± 1 | 1,58 | 1,53 |
| 10^6 | 12 ± 1 | 15 ± 1 | 22 ± 1 | 25 ± 1 | 1,83 | 1,67 |
| 10^7 | 12 ± 1 | 15 ± 1 | 26 ± 1 | 33 ± 1 | 2,17 | 2,2 |
| 10^8 | 12 ± 1 | 15 ± 1 | 31 ± 1 | 38 ± 1 | 2,58 | 2,53 |

Таблица 24 – Результаты постановки РНФ (нестерильная почва)

| Концентрация бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> (м.к./г) | Контроль индикаторного фага (10^4 БОЕ/мл) | Контроль индикаторного фага (10^5 БОЕ/мл) | Опыт (10^4 БОЕ/мл) | Опыт (10^5 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^4 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^5 БОЕ/мл) |
|--|--|--|-----------------------|-----------------------|--|--|
| | | | | | | |
| 10^5 | 11 ± 1 | 13 ± 1 | 14 ± 1 | 19 ± 1 | 1,27 | 1,46 |
| 10^6 | 11 ± 1 | 13 ± 1 | 18 ± 1 | 22 ± 1 | 1,64 | 1,69 |
| 10^7 | 11 ± 1 | 13 ± 1 | 21 ± 1 | 26 ± 1 | 1,91 | 2,00 |
| 10^8 | 11 ± 1 | 13 ± 1 | 24 ± 1 | 29 ± 1 | 2,18 | 2,23 |

Из таблиц 23 и 24 мы видим, что при постановке РНФ с образцом нестерильной почвы произошло снижение эффективности действия бактериофага КлЗ4-УлГАУ, что отражено в снижении отношения количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем.

Таблица 25 – Результаты постановки РНФ (стерильная вода)

| Концентрация бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> (м.к./г) | Контроль индикаторного фага (10^4 БОЕ/мл) | Контроль индикаторного фага (10^5 БОЕ/мл) | Опыт (10^4 БОЕ/мл) | Опыт (10^5 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^4 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^5 БОЕ/мл) |
|--|--|--|-----------------------|-----------------------|--|--|
| | | | | | | |
| 10^5 | 14 ± 1 | 16 ± 1 | 26 ± 1 | 32 ± 1 | 1,86 | 2,0 |
| 10^6 | 14 ± 1 | 16 ± 1 | 29 ± 1 | 39 ± 1 | 2,07 | 2,44 |
| 10^7 | 14 ± 1 | 16 ± 1 | 33 ± 1 | 43 ± 1 | 2,36 | 2,69 |
| 10^8 | 14 ± 1 | 16 ± 1 | 36 ± 1 | л | 2,57 | - |

Таблица 26 – Результаты постановки РНФ (нестерильная вода)

| Концентрация бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> (м.к./мл) | Контроль индикаторного фага (10^4 БОЕ/мл) | Контроль индикаторного фага (10^5 БОЕ/мл) | Опыт (10^4 БОЕ/мл) | Опыт (10^5 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^4 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^5 БОЕ/мл) |
|---|--|--|-----------------------|-----------------------|--|--|
| | | | | | | |
| 10^5 | 12 ± 1 | 14 ± 1 | 20 ± 1 | 25 ± 1 | 1,67 | 1,79 |
| 10^6 | 12 ± 1 | 14 ± 1 | 23 ± 1 | 28 ± 1 | 1,92 | 2,0 |
| 10^7 | 12 ± 1 | 14 ± 1 | 25 ± 1 | 32 ± 1 | 2,08 | 2,29 |
| 10^8 | 12 ± 1 | 14 ± 1 | 30 ± 1 | 37 ± 1 | 2,5 | 2,64 |

Из приведенных данных в таблицах 25 и 26 видно, что, как и в предыдущем случае, происходит снижение чувствительности реакции

нарастания титра фага в образце с нестерильной водой по сравнению со стерильным образцом. Наилучший результат получен при концентрации бактерий 10^8 м.к./мл и при концентрации бактериофага 10^5 БОЕ/мл – увеличение числа видимых негативных колоний произошло в 2,64 раза.

Таблица 27 – Результаты постановки РНФ (стерильный образец капусты)

| Концентрация бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> (м.к./г) | Контроль индикаторного фага (10^4 БОЕ/мл) | Контроль индикаторного фага (10^5 БОЕ/мл) | Опыт (10^4 БОЕ/мл) | Опыт (10^5 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^4 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^5 БОЕ/мл) |
|--|--|--|-----------------------|-----------------------|--|--|
| | | | | | | |
| 10^5 | 13 ± 1 | 15 ± 1 | 26 ± 1 | 31 ± 1 | 2,0 | 2,07 |
| 10^6 | 13 ± 1 | 15 ± 1 | 28 ± 1 | 33 ± 1 | 2,15 | 2,2 |
| 10^7 | 13 ± 1 | 15 ± 1 | 29 ± 1 | 36 ± 1 | 2,23 | 2,4 |
| 10^8 | 13 ± 1 | 15 ± 1 | 31 ± 1 | 38 ± 1 | 2,38 | 2,53 |

Таблица 28 – Результаты постановки РНФ (нестерильный образец капусты)

| Концентрация бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> (м.к./мл) | Контроль индикаторного фага (10^4 БОЕ/мл) | Контроль индикаторного фага (10^5 БОЕ/мл) | Опыт (10^4 БОЕ/мл) | Опыт (10^5 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^4 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^5 БОЕ/мл) |
|---|--|--|-----------------------|-----------------------|--|--|
| | | | | | | |
| 10^5 | 12 ± 1 | 13 ± 1 | 20 ± 1 | 24 ± 1 | 1,67 | 1,85 |
| 10^6 | 12 ± 1 | 13 ± 1 | 23 ± 1 | 25 ± 1 | 1,92 | 1,92 |
| 10^7 | 12 ± 1 | 13 ± 1 | 26 ± 1 | 28 ± 1 | 2,17 | 2,15 |
| 10^8 | 12 ± 1 | 13 ± 1 | 29 ± 1 | 32 ± 1 | 2,42 | 2,46 |

Отметим, что при работе со стерильными образцами капусты был получен положительный результат реакции нарастания титра фага при всех

установленных параметрах концентрации бактериофага (10^4 - 10^5 БОЕ/мл) и индикаторной культуры бактерий (10^5 - 10^8 м.к./мл). С нашей точки зрения данный факт может быть обусловлен обогащением питательной среды за счет компонентов, находящихся в образцах капусты. Однако при работе с нестерильными образцами результаты свидетельствовали о снижении чувствительности РНФ при низкой концентрации бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* (таблица 28).

Таблица 29 – Результаты постановки РНФ (стерильный семенной материал)

| Концентрация бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> (м.к./г) | Контроль индикаторного фага (10^4 БОЕ/мл) | Контроль индикаторного фага (10^5 БОЕ/мл) | Опыт (10^4 БОЕ/мл) | Опыт (10^5 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^4 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^5 БОЕ/мл) |
|--|--|--|-----------------------|-----------------------|--|--|
| | | | | | | |
| 10^5 | 14 ± 1 | 16 ± 1 | 29 ± 1 | 35 ± 1 | 2,07 | 2,19 |
| 10^6 | 14 ± 1 | 16 ± 1 | 31 ± 1 | 40 ± 1 | 2,21 | 2,5 |
| 10^7 | 14 ± 1 | 16 ± 1 | 34 ± 1 | 44 ± 1 | 2,43 | 2,75 |
| 10^8 | 14 ± 1 | 16 ± 1 | 38 ± 1 | л | 2,71 | - |

Таблица 30 – Результаты постановки РНФ (нестерильный семенной материал)

| Концентрация бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> (м.к./мл) | Контроль индикаторного фага (10^4 БОЕ/мл) | Контроль индикаторного фага (10^5 БОЕ/мл) | Опыт (10^4 БОЕ/мл) | Опыт (10^5 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^4 БОЕ/мл) | Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем (10^5 БОЕ/мл) |
|---|--|--|-----------------------|-----------------------|--|--|
| | | | | | | |
| 10^5 | 14 ± 1 | 15 ± 1 | 27 ± 1 | 34 ± 1 | 1,93 | 2,27 |
| 10^6 | 14 ± 1 | 15 ± 1 | 30 ± 1 | 39 ± 1 | 2,14 | 2,6 |

| | | | | | | |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|------|------|
| 10 ⁷ | 14 ± 1 | 15 ± 1 | 34 ± 1 | 44 ± 1 | 2,43 | 2,93 |
| 10 ⁸ | 14 ± 1 | 15 ± 1 | 37 ± 1 | л | 2,64 | - |

Наименьшие колебания в эффективности постановки РНФ наблюдалось при изучении образцов семенного материала. Так, при концентрации бактериофага 10⁵ БОЕ/мл, произошло даже увеличение чувствительности реакции нарастания титра фага.

Таким образом, подводя итог проведенным исследованиям можно утверждать, что при работе с нестерильными образцами происходит снижение чувствительности реакции нарастания титра фага (таблицы 24, 26, 28, 30). Наилучшим образом бактериофаг Кл34-УлГАУ показал себя при концентрации 10⁵ БОЕ/мл против 10⁴ БОЕ/мл при проведении исследований на чистой питательной среде. Как и в предыдущих исследованиях, учет чувствительности реакции нарастания титра фага затруднялся при низких концентрациях бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*, что в итоге сказалось на полученных результатах, представленных в таблицах 22-29.

Учитывая полученные результаты дополнительно был проведен эксперимент с использованием образцов нестерильной почвы, контаминированных бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* в концентрации 10⁵ м.к./мл и дополнительно культивированных при температуре 28 °С в течении 6, 12, 18 и 24 часов. Полученные результаты представлены в таблице 31. Разведение бактериофага - 10⁵ БОЕ/мл.

Таблица 31. Результаты постановки РНФ с нестерильным образцом почвы при предварительном культивировании исходного материала

| Индикаторная культура - <i>X. campestris pv. campestris</i> Хс2; Диагностический бактериофаг – Кл34-УлГАУ; 28 °С; 24ч | Предварительное культивирование изучаемого материала | | | | |
|---|--|---------|----------|----------|---------|
| | без подращивания | 6 часов | 12 часов | 18 часов | 24 часа |
| Увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем, раз | 1,61 | 1,99 | 2,02 | 1,78 | 1,54 |

По итогам проведенных экспериментов было получено, что предварительное культивирование исследуемого нестерильного материала, контаминированного бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* оказывает положительное влияние при времени экспозиции в течение 6 и 12 часов. Более длительного культивирования в итоге снижало чувствительность реакции нарастания титра фага, что, по нашему мнению, вызвано подавлением бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* сопутствующими микроорганизмами.

На основе полученных результатов, считаем, что наиболее эффективной постановка реакции нарастания титра фага с целью индикации бактерий *Xanthomonas 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 105 БОЕ/мл;

- содержимое пробирок с исследуемыми образцами по окончании периода инкубирования в присутствии бактериофага Кл34-УлГАУ фильтруется с применением мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм.

Оптимизированная схема постановки РНФ представлена на рисунке 33.

В соответствии с представленным ранее алгоритмом действий, минимальный время модифицированной схемы 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). На рисунке 33 представлена схема эксперимента.

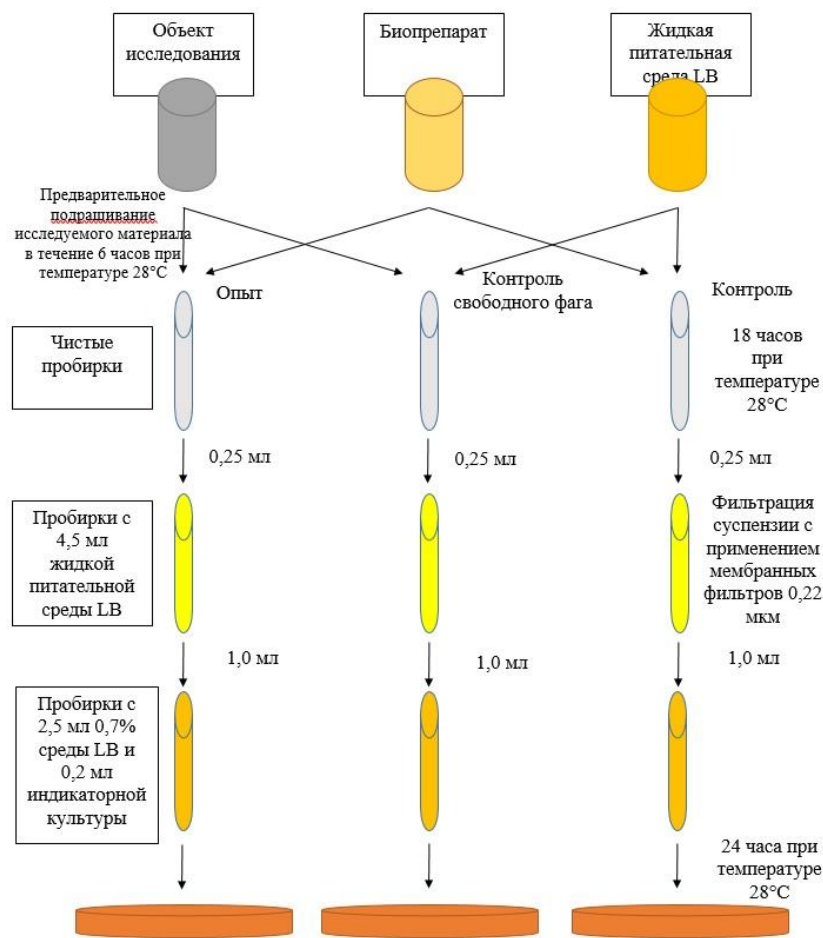


Рисунок 33 – Оптимизированная схема постановки реакции нарастания титра фага с применением разработанного биопрепарата

Ключевыми отличиями данной схемы (рис.33) от предложенной ранее (рис.32) является добавление этапа предварительного культивирования исследуемого материала в течение 6 часов при температуре 28 °С и этапа фильтрации суспензии с применением мембранных фильтров 0,22 мкм.

2.3. Практическое применение схем ускоренной индикации и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris*

Для апробации предложенного алгоритма (рис.33) было отобрано 30 образцов почвы и капусты из хозяйств, где наличие бактериоза было отмечено в предыдущие годы. Далее были проведены исследования по следующей схеме. 5 г исследуемого образца вносили в колбы, содержащие 50 мл LB. Содержимое термостатировали при 28 °С в течение 6 часов. Далее, в соответствии с предложенным алгоритмом и схемой постановки РНФ (рис. 33) проводили следующие действия. Для каждого исследуемого образца использовали по четыре пробирки. Изучаемый материал разливали по 9 мл в пробирки 1 и 2, пробирки 3 и 4 содержали 9 мл среды LB. Далее в пробирки 1 и 3 вносили по 1 мл разработанного биопрепарата в соответствующем разведении, а в пробирку 2 и 4 вносили по 1 мл среды LB. Далее посеvy термостатировали при температуре 28°С в течение 18 часов. По окончании культивирования проб проводили центрифугирование полученных суспензий при 3000 оборотов в течение 20 минут и фильтровали с использованием фильтров с величиной пор 0,22 мкм. Затем проводили разведение изучаемых образцов в соответствии с описанным ранее алгоритмом и исследовали содержимое методом агаровых слоев. Чашки инкубировали при температуре 28 °С в течение 24 часов. Результаты представлены в таблице 32.

Таблица 32 – Результаты исследования образцов почвы и капусты на наличие бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*

| № п/п | Название объекта и месторасположения | Количество выделенных штаммов |
|-------|--|-------------------------------|
| 1. | Образцы почвы Ульяновская область, Старомайнский район (8 образцов) | 2 штамма |
| 2. | Образцы капусты Ульяновская область, Старомайнский район (11 образцов) | 3 штамма |
| 3. | Образцы почвы Ульяновская область, Цильнинский район (4 образца) | 0 штаммов |
| 4. | Образцы капусты Ульяновская область, Цильнинский район (3 образца) | 1 штамм |
| 5. | Образцы почвы Ульяновская область, Павловский район (4 образца) | 1 штамм |

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 бактериологической схемы, представленной на рисунке 12. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Результаты изучения биологических свойств выделенных штаммов

| Обозначение штамма | Свойства | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------------------|-------------|--------------------|------------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|---------------------|-------------|---------|---------|---------|
| | Окраска по Граму | Подвижность | Образование индола | Образование H ₂ S | Реакция с метил-рот | Реакция Фогеса-Проскауэра | Гидролиз крахмала | Разжижение желатина | Ферментация | | | |
| | | | | | | | | | сахарозы | глюкозы | сорбита | лактозы |
| X1 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| X2 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| X3 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| X4 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| X5 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| X6 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| X7 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - |

Примечание: «+» - положительный результат, «-»- отрицательный результат.

Таким образом, основываясь на данных, представленных в таблице 33, можно сделать вывод, что апробированная схема реакции нарастания титра фага с использованием индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ позволяет достоверно определить наличие в субстрате бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Отметим, что помимо 7 образцов, показавших положительный результат РНФ, также были проведены исследования и с остальными 23

образцами по схеме, предложенной на рисунке 12, при этом бактерии *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* обнаружены не были.

На основе полученных данных было принято решение модифицировать бактериологическую схему дополнительным тестом с применением разработанного биопрепарата на основе бактериофага *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Кл34-УлГАУ. Данная модификация позволит повысить достоверность получаемых результатов, особенно на промежуточном этапе. Модифицированная схема идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* представлена на рисунке 34.

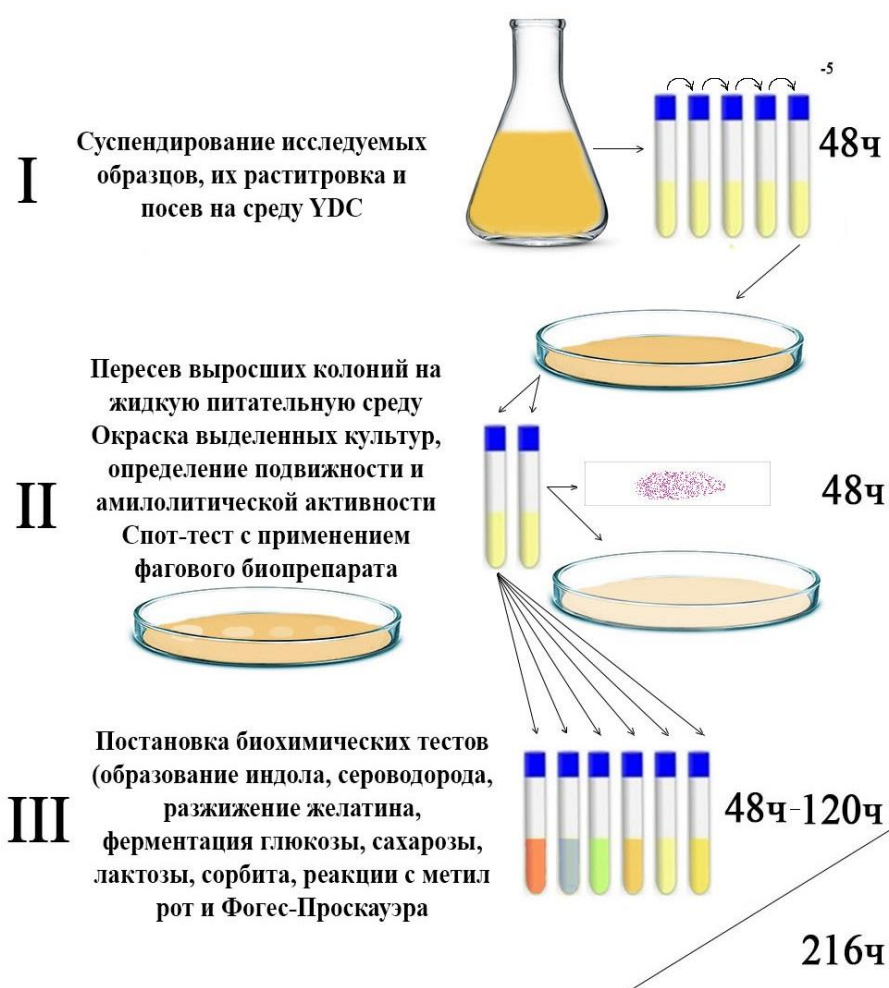


Рисунок 34. Экспресс методы выделения и идентификации бактерий *X. campestris* pv. *campestris* с применением разработанного биопрепарата

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 амилитической активности. Проводится изучение ферментативной активности. Проводится фагоидентификация методом «стекающая капля» или спот-тестом. Результат II этапа – выделение грамотрицательных бактерий, подвижных и проявляющих амилитическую активность, каталазоположительность, оксидазоотрицательность, положительный реакция с бактериофагом.

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактериальные заболевания растений являются важной причиной снижения урожайности в сельском хозяйстве, поскольку в настоящее время нет эффективных средств борьбы с ними. В крестоцветных овощах, принадлежащих к виду *Brassica oleracea* (например, капуста, цветная капуста и брюссельская капуста), наиболее важным бактериальным заболеванием является сосудистый бактериоз капусты, вызванный бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

X. campestris pv. *campestris* является возбудителем сосудистого бактериоза у крестоцветных культур, включая все культивируемые растения рода *Brassica*. Сосудистый бактериоз во всем мире считается самой вредоносной болезнью для овощных культур капусты, включая капусту, цветную капусту и другие. Сообщается о происшествиях со всех континентов, где выращиваются культуры семейства Brassicaceae, в основном в теплых и влажных условиях. Бактерии рода *Xanthomonas* распространены по всему миру, в особенности в районах, где выпадает много осадков, при средней температуре от 25 до 30 °С.

Стандартные методы борьбы с данным заболеванием, к которым относят использование семенного материала хорошего качества, севооборот, выращивание менее восприимчивых сортов, не обеспечивают удовлетворительного контроля заболеваний, особенно когда погодные условия благоприятствуют распространению возбудителя. В настоящее время применение бактериофагов для идентификации и борьбы с возбудителями бактериальных болезней растений является быстро расширяющимся направлением. Бактериофаги в большей степени выгодны и могут быть использованы в качестве антибактериальных мер тогда, когда бактерии-возбудители широко представлены в природе.

В связи с этим наши исследования были направлены на выделение вирулентных специфических бактериофагов, активных в отношении

бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, изучению их свойств и разработке биотехнологических параметров для изготовления фагового препарата.

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, занимающихся выращиванием сельскохозяйственных культур семейства Капустные и 91 образец капусты с признаками поражения бактериозом. Выделение бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* проводили по методикам, опробованным на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ, идентификацию микроорганизмов проводили на основе тестов, представленных в литературных источниках. На основе проведенных опытов была предложена бактериологическая схема выделения и ускоренной идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, включающая морфологические и биохимические признаки, состоящая из 4 этапов с временем постановки 216 часов. По результатам проведенных исследований было выделено 6 штаммов бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, имеющих схожие биологические свойства с референс-штаммами, а также литературными данными.

Второй этап работы был посвящен выделению бактериофагов, специфичных в отношении бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Изначально проводили выделение бактериофагов из культур бактерий путем воздействия на них индуцирующим фактором, в частности применялись ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), источником которых служила ртутная газоразрядная лампа, при уровне излучаемой энергии в виде УФ-лучей не менее 90% с длиной волны в пределах 250-260 нм. Эксперимент проводили в затемненном помещении без доступа солнечных лучей с целью предохранения культур микроорганизмов, подвергшихся облучению, от фотореактивации.

Также выделение профага из бактериальных клеток проводили путем воздействия 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*. Переход профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий обнаружен не был, в связи с чем дальнейшее выделение бактериофагов проводили из объектов внешней среды по методикам, описанным Д.М. Гольдфарбом в модификации И.П. Ревенко.

Для этого навеску массой 10 г исследуемого материала суспендировали в 50 мл МПБ. Затем в получившуюся суспензию добавляли по 2 мл 24-часовых культур бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Хсс 14-УГСХА и культивировали при 28 °С в течении суток. Далее очищали исследуемый субстрат от механических примесей путем фильтрования через ватный фильтр, разливали в центрифужные пробирки и центрифугировали при 3000 об в течении 30 мин. Полученный фильтрат очищали различными методами – прогреванием на водяной бане, добавлением в фильтрат хлороформа в концентрации 1:10, фильтрованием через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм. В соответствии с проведенными исследованиями лучше всего очистка бактериофагов от клеток бактерий проходили при добавлении в суспензию хлороформа в соотношении 1:10 и при времени экспозиции в течение 20 минут. Прогревание суспензии негативно сказывалось на литической активности. При этом существенное влияние на лизис бактериальных клеток оказывал состав питательной среды. Так плотные питательные среды, содержащие источник углеводов, показали большую устойчивость к действию бактериофагов. После этого полученные субстраты исследовали на наличие в них бактериофагов методом «стекающая капля». Для этого на поверхность плотной питательной среды LB наносили несколько капель суточной культуры бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Хсс 14-УГСХА, далее стерильным шпателем растирали капли по

поверхности среды и термостатировали при 28 °С в течении 20-30 минут с целью подсушивания «газона». Затем наносили каплю исследуемого фильтрата на поверхность среды и наклоняли чашку Петри. После чего чашки термостатировали при 28 °С в течении 48 часов. О наличии бактериофагов судили по появлению зон лизиса в местах нанесения капель. Селекцию бактериофагов проводили путем десятикратного пассирования бактериофага на индикаторной культуре.

По итогам проведенных исследований было селекционировано 10 изолятов бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris*, выделенных из образцов почвы и капусты с признаками поражения от бактериозов с полей г. Ульяновска и Ульяновской области. Все выделенные бактериофаги являются активными по отношению к бактериям *X. campestris pv. campestris*.

По результатам изучения основных биологических свойств бактериофагов было установлено, что негативные колонии 10 изолятов бактериофагов *X. campestris pv. campestris* являются небольшими однотипными, прозрачными, с округлой или неправильной формой. Размер в диаметре составлял 0,5-3 мм. Рост негативных колоний, выделенных бактериофагов на питательной среде, содержащей источник углеводов (YDC), проявлялся в виде небольших углублений. Данное явление, по нашему мнению, обусловлено выделением бактериями большого количества экзополисахарида на питательных средах, содержащих источник углеводов.

Изучение специфичности бактериофагов являлось важным критерием для их применения в составе биопрепарата с целью индикации и идентификации, поскольку от этого напрямую зависит точность проводимых исследований. Специфичность выделенных бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* изучалась методом «стекающей капли», для чего на заранее подготовленные чашки Петри с плотной средой LB наносили газон следующих видов бактерий *Xanthomonas euvesicatoria*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas oryzae*.. Специфичность исследуемых бактериофагов определяли по их способности

лизировать культуры *Xanthomonas campestris pv. campestris* и по отсутствию лизиса на других культурах. В соответствии с полученными данными все выделенные изоляты являлись строго специфичными 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. Результаты проведенных исследований показали, что по методу Аппельмана литическая активность выделенных бактериофагов колеблется в пределах 10^6 - 10^9 БОЕ/мл, по методу Грация литическая активность находилась в пределах от $2,4 \times 10^6$ до $2,6 \times 10^8$ БОЕ/мл. Наилучшей литической активностью обладал бактериофаг Кл34-УлГАУ, показавший по методу Аппельмана до 10^9 БОЕ/мл, по методу Грация до $2,6 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$ БОЕ/мл.

Одной из важнейших характеристик выделенных бактериофагов являлся спектр литического действия. Для изучения спектра литического действия выделенных бактериофагов использовали 6 штаммов бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*, выделенных нами из образцов почвы и пораженных растений, а также 5 коллекционных штаммов. Исследования проводили нанесением исследуемого бактериофага на газоны бактериальных культур методом спот-теста. По результатам проведенных исследований установлено, что спектр литического действия выделенных бактериофагов находился в пределах 54,5 – 96,9 % изученных штаммов бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris*. 3 из 10 выделенных бактериофагов (Кл13-УлГАУ, Кл22-УлГАУ и Кл34-УлГАУ) имели спектр литического действия более 90%.

Для дальнейших исследований, направленных на конструирование 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 широким спектром литического действия (96,9% изученных бактериальных культур).

Важнейшими технологическими параметрами изготовления и контроля бактериофагов, входящих в состав биопрепарата, являются способ очистки бактериофага от производственной культуры, количественное соотношение фага и культуры, температура культивирования и оптимальное соотношение между временем пассажа и активностью фага.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что наиболее предпочтительным методом очистки суспензии от бактериальных клеток является фильтрация через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм, поскольку это позволяет сохранить наивысший уровень литической активности.

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 9 данные. При данных соотношениях фага и культуры были получены практически идентичные результаты ($1,1 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$; $2,3 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$).

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 эти оптимальным в качестве технологического параметра для изготовления фагового препарата считаем время пассажа 24 ч.

Диапазон оптимальной температуры культивирования бактериофага Кл34-УлГАУ находится в пределах 20–32°С. Отметим, что при культивировании образцов при температуре 12-16 °С видимого роста бактерий в исследуемых пробирках, также как и в контрольных не наблюдалось.

Изготовление биопрепарата проводится путем культивирования бактериофага Кл34-УлГАУ на жидкой питательной среде LB с производственной культурой *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2.

Перед началом изготовления проверяется соответствии производственного штамма бактериям *Xanthomonas campestris pv. campestris* по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам. Изучается активность индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ к производственному штамму *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 после хранения и проводится пассирование индикаторного бактериофага.

Далее, исходя из представленных ранее параметров, изготовление и масштабирование производства проводится в 3 этапа.

По окончанию наработки бактериофагов производится их контроль по показателям 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. Хранение биопрепарата производят при температуре 2-4 °С. Срок годности биопрепарата составляет 12 месяцев.

Следующий этап работы был посвящен определению оптимальных параметров постановки РНФ и отработки ее количественных показателей. В качестве тест-объекта выступала искусственно контаминированная жидкая питательная среда LB. Концентрация индикаторной культуры *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 составляла $10^3 - 10^8$ м.к./мл. Рабочая концентрация бактериофага при постановке РНФ составляла 10^2-10^5 БОЕ/мл. Кроме того, были проведены исследования по определению оптимального времени постановки РНФ, времени пассажа, времени предварительного культивирования индикаторной культуры. В качестве положительной чувствительности реакции нарастания титра фага было принято увеличение количества негативных колоний в опытной пробе по сравнению с контрольной в 2 и более раза.

При культивировании посевов в течение 6 и 12 часов наблюдалась отрицательная либо слабо положительная чувствительность РНФ, о чем свидетельствовало увеличение количества БОЕ индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ менее чем в 2 раз.

По результатам проведенных исследований было установлено, что количественный показатель бактериофага Кл34-УлГАУ при культивировании в течении 18 часов в опытной пробе был более чем в 2 раз выше количественного показателя бактериофага Кл34-УлГАУ в контрольной пробе при начальной концентрации бактериальной массы *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 в жидкой питательной среде LB 10^7 - 10^8 м.к./мл.

В ходе проведения экспериментов было принято отказаться от использования индикаторной культуры *Xanthomonas campestris pv. campestris* Хс2 в концентрации ниже 10^7 м.к./мл. Это было связано с отсутствием образования газона культуры при низких концентрациях бактерий и невозможности подсчета негативных колоний.

Однако, при выделении бактерий из объектов внешней среды не всегда удается получить их концентрацию в количестве не менее 10^7 м.к./мл, остается необходимость их индикации при более низкой концентрации. Нами было предложено использование дополнительной количественной методики определения степени увеличения количества БОЕ индикаторного бактериофага в опытных пробах, суть которой сводится к тому, что вместо подсчета негативных колоний на газоне бактериальной культуры, производится подсчет количества отдельно выросших колоний индикаторной культуры. В качестве положительной динамики увеличения количества БОЕ индикаторного бактериофага свидетельствует снижение количества отдельно выросших колоний бактерий по сравнению с контрольным образцом. Данная методика может быть эффективно применена в тех случаях, когда начальная концентрация бактерий в исследуемом образце является недостаточной для образования сплошного газона бактериальной культуры.

Предварительное подращивание индикаторной культуры в течение 6, 15 и 24 ч не давало ощутимого результата, который повлиял бы положительно на конечный результат, при это увеличивалось общее время экспозиции. Кроме того, в отдельных случаях при дополнительном подращивании культуры наблюдалось снижение чувствительности РНФ.

В соответствии с этим минимальный временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ составил 43 часа (30 мин - на подготовительные мероприятия; 18 часов - термостатирование посевов с индикаторной культурой и индикаторным бактериофагом; 30 мин - высев содержимого пробирок методом Грациа; 24 часа - культивирование на чашках Петри). Предварительное подращивание исследуемого материала при одновременном увеличении общего времени на постановку РНФ в достаточной степени на данном этапе не позволяло повысить чувствительность реакции.

Дальнейшие исследования были посвящены отработке предложенной схемы реакции нарастания титра фага при использовании с различными объектами внешней среды (почва, вода, части растений, семенной материал).

Были проведены исследования по отработке реакции нарастания титра фага с нестерильными образцами почвы, воды, семенного и растительного материалов, которые были искусственно контаминированны бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* в концентрации 10^5 - 10^8 м.к./мл. В качестве рабочей концентрации использовали бактериофаг Кл34-УлГАУ в концентрациях 10^4 - 10^5 БОЕ/мл. Данные концентрации бактериофага были использованы в проведенных экспериментах, поскольку при этих значениях был получен наилучший результат постановки реакции нарастания титра фага при подборе параметров постановки РНФ.

По итогам проведенных исследований установлено, что 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 течение 6, 12, 18 и 24 часов. По итогам проведенных опытов установлено, что предварительное культивирование исследуемого нестерильного материала, контаминированного бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* оказывает положительное влияние при времени экспозиции в течение 6 и 12 часов. Более длительного культивирования в итоге снижало чувствительность реакции нарастания титра фага, что, по нашему мнению, вызвано подавлением бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* сопутствующими микроорганизмами.

Наиболее эффективной постановка РНФ с целью индикации бактерий *Xanthomonas 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 105 БОЕ/мл;
- содержимое пробирок с исследуемыми образцами по окончании периода инкубирования в присутствии бактериофага Кл34-УлГАУ фильтруется с применением мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм.

Затрачиваемое время на постановку реакции нарастания титра фага, составляет приблизительно 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).

Эффективность предложенной схемы была подтверждена при исследовании 30 образцов почвы и капусты из хозяйств, где наличие бактериоза было отмечено в предыдущие годы.

В соответствии с полученными результатами увеличение титра индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ более чем в два раза наблюдалось при исследовании 7 образцов почвы и капусты. Данные результаты были также подтверждены изучением биохимических свойств выделенных бактерий, в соответствии с ранее предложенной схемой выделения и идентификации, которая была дополнена спот-тестом с использованием разработанного биопрепарата. Разработанный экспресс-метод выделения и идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* на основе их биологических свойств и с применением разработанного биопрепарата, позволяет идентифицировать искомые микроорганизмы в течение 216 часов.

По материалам диссертационных исследований разработана нормативно-техническая документация: «Методические рекомендации по особенностям культивирования, хранения, очистки и концентрации бактериофагов, активных в отношении бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*», «Методические рекомендации по ускоренной индикации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* методом реакции нарастания титра фага в объектах санитарного надзора», «Методические рекомендации 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*». (приложение 4-7).

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 *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 технологические 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, амилолитической активности и постановка спот-теста с использованием разработанного биопрепарата; изучение биохимических свойств выделенных штаммов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Предлагаем использовать для выявления бактерий *Xanthomonas campestris pv. campestris* в концентрации 10^5 м.к./г в объектах внешней среды и в посевном материале 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. Предлагаем проводить выделение и бактериальную идентификацию *Xanthomonas campestris pv. campestris* по предложенной методике на основе биохимических тестов с использованием биопрепарата на основе высокоспецифичного бактериофага Кл34-УлГАУ методом «стекающая капля» или постановкой спот-теста.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jensen B.D. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal / B.D. Jensen, J.G. Vicente, H.K. Manandhar et al. // Plant Dis. 2010. Vol.94. pp. 298-305.
2. Ignatov A.N. Black rot of brassicas in Russia – epidemics, protection, and sources for resistant plants breeding / A.N. Ignatov, S.V. Panchuk, Vo Thi Ngok Ha et al. // Картофель и овощи. 2016. №2. С. 15-16.
3. Щербаков А.А. Получение специфических антител к клеточным мембранам *Xanthomonas campestris* /, М.А. Кузнецов, С.В. Савина, В.М. Скорляков, С.В. Иващенко, В.С. Муртаева, В.Э. Маниесон // Аграрный научный журнал. 2017. № 6. С. 46-49.
4. Jagtap G.P., Dhutraj D.N., Dey U. Principles of plant pathology // Agro House. 2012. P. 309
5. ISTA. 7-019 Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on *Brassica* spp. (Prepared by Roberts, S.J. and Koenraadt, H.) International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods, Bassersdorf, Switzerland, International Seed Testing Association (ISTA). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-019a-2014.pdf>
6. Massomo S. Biological control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains / S.M.S. Massomo, C. N. Mortensen, R. B. Mabagala, et al// J. Phytopathol. 2004. Vol.152. pp. 98–105.
7. Francisco-Francisco N. Fundamental aspects of common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Characteristic, pathogenicity and control / N. Francisco-Francisco, G. Gallegos Morales et al. // Revista mexicana de fitopatología. 2013. Vol.31. No2. pp. 147-160.
8. Svircev A., Roach D., Castle A. Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture // Viruses. 2018. Vol.10. p.218

9. Civerolo E.L. Relationships of *Xanthomonas pruni* Bacteriophages to Bacterial Spot Disease in Prunus // *Phytopathology*. – 1973. – Vol.63(10). – p. 1279.
10. Trindade L. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris pv. viticola* / L. Trindade, E. Marques, D. Lopes, M. Ferreira // *Summa Phytopathologica*. 2007. Vol.33. pp. 16-23.
11. Grimault V., Andro C., Politikou A. Report on validation of PCR as a new identification method of *Xanthomonas campestris pv. campestris* on Brassica spp. seed // *Seed Testing International*. 2012. Vol.143. pp. 35-38
12. Fatmi M., Walcott R.R., and Schaad N.W. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. 2016. P. 360
13. Çavuşoğlu K. Biochemical and molecular identification of *Xanthomonas campestris pv. campestris* the causal agent of black rot on crucifers / K. Çavuşoğlu, U. Şanver, G. Eryigit // 1st International Molecular Plant Protection Congress. 2019, At Adana
14. Corzo M., Quiñones M., Pauls K. First report of *Xanthomonas campestris* causing black rot of chard in Cuba // *New Disease Reports*. 2019. Vol.39. P.13
15. Clokie M.R. Phages in nature / M.R. Clokie et al. // *Bacteriophage*. 2011. Vol.1. pp. 31–45.
16. Shukla R. Characterization of lytic bacteriophage XCC9SH3 infecting *Xanthomonas campestris pv. campestris* / R. Shukla, M. Bhoyar, U. Singh, et al. // *Journal of Plant Pathology*. 2017. Vol.99 (1). pp. 233-238.
17. Silva Y.J. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture / Y.J. Silva, L. Costa, C. Pereira // *Microb. Biotechnol*. 2014. Vol.7, pp. 401–413
18. Doss J. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms / J. Doss, K. Culbertson, D. Hahn et al.// *Viruses*. 2017. Vol.9(3). p.50

19. McCallin S. Current State of Compassionate Phage Therapy / S. McCallin, J.C. Sacher, J. Zheng, B.K. Chan // *Viruses*. 2019. Vol.11(4). P.343
20. Феоктистова Н.А. Бактериофаги рода *Bacillus* и перспективы их применения / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин // Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности: научно-практический семинар с международным участием. 2011. - С. 136-139.
21. Калдыркаев А.И. Алгоритм фаготипирования бактерий *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, Т.Г. Юдина, Е.Г. Климентова // *Агробизнес и экология*. 2015. № 2(2). С. 166-169.
22. Чугунова Е.О., Татарникова Н.А. Применение бактериофагов для детекции бактерий (обзор литературы) // *Пермский аграрный вестник*. 2016. №4 (16). С. 121-126
23. Jones, J. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. Jones, G. Vallad, F. Iriarte // *Bacteriophage*. 2012. Vol.2. pp.208-214
24. Loc-Carrillo C., Abedon S.T. Pros and cons of phage therapy // *Bacteriophage*. 2011. Vol.1. pp. 111–114
25. Во Тхи Нгок Ха. Генетическое разнообразие возбудителя сосудистого бактериоза в России: реакция растений / Во Тхи Нгок Ха, Ф.С. Джалилов, С.В. Виноградова Е.И. Кырова, А.Н. Игнатов // *Защита картофеля*. 2014. № 2. С. 26-28.
26. Орынбаев А.Т. Выделение бактериофагов *Xanthomonas campestris pv. campestris* и их использование для защиты капусты от сосудистого бактериоза / А.Т. Орынбаев, Кабанова А.П., Образцова Е.А., А.Н. Игнатов, К.А. Мирошников, Ф.С. Джалилов // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2019. №2. С. 35-48

27. Sutton M.D., Katznelson H., Quadling C. A bacteriophage that attacks numerous phytopathogenic *Xanthomonas* species // Canadian Journal of Microbiology. 1958. Vol. 4. pp. 493-497.
28. Widadi, S. Exploration of bacteriophage virulent to *Xanthomonas campestris pv campestris* toward development as biocontrol agent for cabbage black rot disease/ S. Widadi, L. Darsana, S. Sumijati // Jurnal Caraka Tani. – 2012. – Vol. XXVII. – No.1. – pp. 7-14.
29. Antelo G. A Spectroscopy-based Methodology for Rapid Screening and Characterization of Phytochrome Photochemistry in Search of Pfr-favoured Variants / G. Antelo, M. Sánchez-Lamas, F.A. Goldbaum et al. // Photochemistry and Photobiology. 2020.
30. Michalopoulou V. Draft Genome Sequences of Pathotype Strains for Three Pathovars Belonging to Three *Xanthomonas* Species / V. Michalopoulou, J. Vicente, D. Studholme // Genome Announcements. 2018. Vol.7(12). pp. 1-2
31. Eichmeier A. Detection of *Xanthomonas campestris pv. campestris* through a real-time PCR assay targeting the Zur gene and comparison with detection targeting the hrpF gene / A. Eichmeier, E. Penazova, R. Pokluda et al. // European Journal of Plant Pathology. 2019. Vol.155. pp. 891–902
32. Ragasová L. The Change of Bacterial Spectrum after Storage of *X. campestris pv. campestris* Inoculated Cabbage Heads (*Brassica oleracea var. capitata* L.) / L. Ragasová, E. Penazova, F. Gazdik // Agronomy. 2020. Vol.10. p.443.
33. Doige E.M. A tomato canker // Annals of Applied Biology. 2008. Vol.7(4). pp.407 - 430
34. Dowson W.J. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens // Zentralb. Bakt. II. 1939. Vol. 100. pp. 177–193.
35. Vauterin L. Reclassification of *Xanthomonas* / L. Vauterin, B. Hoste, K. Kersters et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. Vol. 45. pp. 472–489.

36. National collection of plant pathogenic bacteria – NCPPB. Título Artigo. [электронный ресурс]. Точка доступа: www.ncppb.com
37. Burkholder W.H. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. In Bergey's manual of Determinative Bacteriology // Breed RS Murray AGD & Smith NR (eds). 1957. pp. 152–183.
38. Van den Mooter M. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus / M. Van den Mooter, J. Swings et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1990. Vol.40. pp.348–369
39. Swings, J. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* / J. Swings, P. De Vos, M. Van den Mooter et al. // International Journal of Systematic Bacteriology. 2014. Vol.33(2). – pp.409–413.
40. Palleroni, N.J. Deoxyribonucleic acid relatedness of 21 strains of *Xanthomonas* species and pathovars / N.J. Palleroni, D.C. Hildebrand, M.N. Schroth // J. Appl. Bacteriol. 2008. Vol.75. pp. 441–446.
41. Zhang S. Relations among epiphytic microbial communities from soil, leaves and grapes of the grapevine / S. Zhang, X. Chen, Q. Zhong // Frontiers in Life Science. 2017. Vol.10(1). pp.73-83
42. Chege M.N. Phenotypic and genotypic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing bacterial blight disease of cassava in Kenya / M.N. Chege, F. Wamunyokoli, J. Kamau / J App Biol Biotech. 2017 Vol.5(02) pp.38-44
43. Stackebrandt E. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the «purple bacteria and their relatives» / E. Stackebrandt, R.G.E. Murray, H.G. Truper // Int. J. Syst. Bacteriol. 1988. Vol.38. pp. 321–325.
44. Kyrova E.I. Evolution history of plant pathogenic *Xanthomonas arboricola* infecting wide-range of host plants / E.I. Kyrova, E.V. Kalabashkina, A.N. Ignatov // ACTA NATURAE. СПЕЦИАЛЬНЫЙ №1. 2017. Т.9. С. 55.

45. Hildebrand D.C., DNA relatedness of 24 xanthomonad strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae* / D.C. Hildebrand, N.J. Palleroni, M.N. Schroth // J. Appl. Bacteriol. 1990. Vol.68: pp. 263–270.
46. Vauterin L., Swings J., Kersters K. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1990. Vol.40. pp. 312–316.
47. Parkinson N. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences / N. Parkinson, V. Aritua, J. Heeney et al // Int. J. of Syst. and Evol. Microbiology. 2007. Vol. 57. pp. 2881-2887.
48. Mansfield J. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology / J. Mansfield, S. Genin, S. Magori et al. // Mol. Plant Pathol. 2012. Vol.13. pp. 614–629.
49. Vicente J.G., Holub E.B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops // Mol. Plant Pathol. 2013. Vol.14. pp. 2–18.
50. Ombuna G.J., Nyangeri B.J. Maobe S.N. Control of black rot disease in cabbage by integration of mulching, pruning and hot water treatment of seeds // Plant Pathology & Quarantine 2019. Vol.9(1). pp. 23–29.
51. Nooprom K., Santipracha Q. Incidence of Bacterial Disease and Yield of Broccoli as Influenced by Different Rain Protectors and Varieties during the Rainy Season in Southern Thailand // Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology. 2014. Vol.7(13) pp.2687-2692
52. Fargier E., Manceau C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris* // Plant Pathol. 2007. Vol.56. pp. 805–818.
53. Vicente J.G. A Podridao negra das cruciferas // Cent. Oper. e Technol. Hortofrutic. 2004. pp. 166.
54. Lema M. Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by Brassica spp. genotypes and rep-

PCR / M. Lema, M.E. Cartea, T. Sotelo et al. // Eur. J. Plant Pathol. 2012. Vol.133. pp.159–169.

55. Mulema J.M.K. Vicente J.G., Pink D. Characterization of isolates that cause black rot of crucifers in East Africa // Eur. J. Plant Pathol. 2011. Vol.133. pp.427–438.

56. Kamoun S., Kamdar H. V., Tola E. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: Role of the hrp X locus / S. Kamoun, H.V. Kamdar, E. Tola et al. // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1992. Vol.5. pp. 22–23.

57. Crossman L., Dow J.M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris* // Microbes Infect. 2004. Vol.6. pp. 623–629.

58. Torres P.S. Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris* / P.S. Torres, F. Malamud, L.A. Rigano et al. // Environ. Microbiol. 2007. Vol.9. pp. 2101–2109.

59. Vojnov A.A., Slater H., Daniels M.J. Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta // Molecular plant-microbe interactions: MPMI. 2001. Vol.14. pp. 768–774.

60. Rudolph K., Ebrahim-Nesbat F., Mendgen K. Cytological observations of leaf spot-causing bacteria in susceptible and resistant hosts // Plant pathogenic bacteria. 1987. pp 604–612.

61. Агротех-Гарант. Сосудистый бактериоз капусты. [электронный ресурс] Режим доступа: <http://agroteh-garant.ru>.

62. Samson R., Afri A., Carvil N. Criteria for identification of *Xanthomonas campestris* causing wilt of graminiae // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2009. Vol.19. pp. 43–50.

63. Corey R.R. Starr M.P. Colony types of *Xanthomonas phaseoli* // J. Bacteriol. 1957. Vol.74. pp. 137–140.

64. Molinaro A., Lanzetta R., Evidente A. Isolation and characterisation of the lipopolysaccharide from *Xanthomonas hortorum* pv. *vitians* // FEMS Microbiology Letters. 2006. Vol.181(1). pp.49 - 53

65. Ewbank E., Maraite H. Amino acid catabolism in *Xanthomonas campestris* pathogenesis // Proceedings of the Seventh International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. 1990. pp. 111–16.
66. Starr M.P. Weiss J.E. Growth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagin medium // Phytopathology. 1943. Vol.33. pp. 314–318.
67. Starr M.P. The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutritive requirements of the genus *Xanthomonas* // Journal of Bacteriology. 1946. Vol.51. pp. 131–143.
68. Dye D.W. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp // N. Z. J. Sci. 1962. Vol.5. pp. 393–416
69. da Silva Romeiro R., Moura A.B. Bacterial blight (*Xanthomonas campestris*) of sunflower (*Helianthus annuus*), a new disease // Rev. Ceres. 1998. – Vol.45. pp. 233–243.
70. Schaad N.W., Stall R.E. *Xanthomonas*. In Schaad (Editor), Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria // APS Press, Minneapolis. 1988. pp. 81–94.
71. Ghosh R. Diagnostic Techniques of Soil Borne Plant Diseases: Recent Advances and Next Generation Evolutionary Trends / R. Ghosh, A. Tarafdar, D. Chobe et al. // Biological Forum – An International Journal. 2019. Vol.11(2) pp.01-13(
72. Lewis I.M. Growth of plant pathogenic bacteria in synthetic culture media with special reference to *Phytomonas malvaceara* // Phytopathology. 1930. Vol.20. pp. 723–731.
73. S.G. Borkar Laboratory Techniques in Plant Bacteriology // CRC Press. 2018. P.320
74. Durgapal J.C. Albinism in *Xanthomonas* sesame // Curr. Sci. (Bangalore). 1977. Vol.46. pp. 274.
75. Büttner D., Bonas U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors // EMS microbiology reviews. 2009. Vol.34(2). pp.107-33.

76. Su P. Insights Into the Roles of Two Genes of the Histidine Biosynthesis Operon in Pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* / P. Su, W. Z. Song, G. Wu et al. // *Phytopathology*. 2017. Vol. 108(5).
77. Starr M.P., Starr M.P., Stephens W.L. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas* // *J. Bacteriol.* 1964. Vol.87. pp. 293–302.
78. Xiaohui D. Construction and application of a *Xanthomonas campestris* CGMCC15155 strain that produces white xanthan gum / D. Xiaohui, G. Gao, M. Wu et al. // *MicrobiologyOpen*. 2017. Vol.8(2)
79. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. *Bergey's 11. Manual of Systematic Bacteriology*, Vol .2, Part B: The Gammaproteobacteria. 2nd ed. // Berlin.: Springer-Verlag. 2005. 1136 p.
80. Stall R.E., Beaulieu C., Egel D. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994. Vol.44. pp. 47–53.
81. Dhakal U. Phylogenetic Analyses of *Xanthomonads* Causing Bacterial Leaf Spot of Tomato and Pepper: *Xanthomonas euvesicatoria* Revealed Homologous Populations Despite Distant Geographical Distribution / U. Dhakal, A.M. Alvarez, S. Dobhal, M. Arif // *Microorganisms*. 2019. Vol.7(10). pp.462
82. Мазурин Е.С. Оценка штаммового разнообразия возбудителя сосудистого бактериоза капусты / Е.С. Мазурин, А.Н. Игнатов, Е.В. Матвеева, Ф.С. Джалилов // *Известия ТСХА*, 2010. №5. С. 66-75.
83. Lakshmi Prasanna S., Ravi S. Isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot on cauliflower from plains of Kerala // *International journal of scientific research*. 2014. Vol.3. No.2. pp. 4-6.
84. Berthier Y., Verdier V., Guesdon J.L. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns / Y. Berthier; // *Applied and environmental microbiology*. 1993. Vol.59(3). pp. 851–59.

85. Vauterin L., Yang P., Alvarez A. Identification of nonpathogenic *Xanthomonas* strains associated with plants // Syst. Appl. Microbiol. 1996. Vol.19. pp. 96–105.
86. Duncan R.W. Interaction of Common Bacterial Blight Bacteria with Disease Resistance Quantitative Trait Loci in Common Bean / R.W. Duncan, S.P. Singh, R.L. Gilbertson // Phytopathology. 2011. Vol.101(4). pp.425-35.
87. Габор Б., Као Дж., Краузе Д. Руководство по болезням крестоцветных / Semeniz. 2013. 27 с.
88. Корнев К.П. Черная бактериальная пятнистость томатов в России / К.П. Корнев, Е.В. Матвеева, Э.Ш. Пехтерева, В.А. Политыко, А.Н. Игнатов, Н.В. Пунина // Защита и карантин растений, 2010. №5. С. 48-49.
89. Игнатов А.Н. Бактериозы в России: угроза реальна // Агро XXI, 2012. С. 10-12.
90. Mwangi, M. Development of a semi selective medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from insect vectors, infected plant material and soil // Plant Pathol. 2007. Vol.15. pp. 383- 390.
91. Nuñez A.M. Bio-based products control black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and increase the nutraceutical and antioxidant components in kale / A.M. Nuñez, G. Rodríguez, F. Monteiro et al. // Scientific Reports, 2018. Vol. 8. p.11
92. Приходько С.И., Селицкая О.В. Антагонистические свойства бактерий, выделенных из листьев капусты // Агроэкоинфо. 2015. №6(22). С. 7.
93. Monteiro L., Ramos Mariano R.L., Souto-Maior A.M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // Brazilian archives of biology and technology. 2005. Vol.48(1). pp. 23-29
94. Choi S.H. Pathogenicity and bacteriological characterization of *Xanthomonas campestris* from mulberry / Choi, S.H. et al. // Korean Journal of Plant Pathology. 1988. Vol.4. pp. 143–148.

95. Timilsina S. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions / S. Timilsina, N. Potnis, E. Newberry et al. // Nature Reviews Microbiology. 2020. Vol.18(8)
96. Sudo, T. Bioinformatics Analysis of the Complete Genome Sequence of the Mango Tree Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 Reveals Traits Relevant to Virulence and Epiphytic Lifestyle / P.M. Martínez-García, P. Rodriguez, E. Arrebola et al. // PLoS ONE. 2015. Vol.10(8)
97. Swings J., Vauterin L., Kersters K. The bacterium *Xanthomonas* // Chapman & Hall. 1993. P.401
98. Sharma H. Evaluation of Transgenic Plants and Mapping Populations for Resistance to Insect Pests // Biology. 2008. P.42
99. Wulff E.G. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe / E.G. Wulff, C.M. Mguni, C.N. Mortensen et al // Eur. J. Plant Pathol. 2002. Vol.108. pp. 317–325.
100. Mishra S., Arora N.K. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *campestris* //World J Microb Biot. 2012. Vol.28. pp. 693–702.
101. Фундаментальная фитопатология / Под ред. Ю. Т. Дьякова // М.: КРАСЛНД, 2012. 512 с.
102. Leyns F. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp / V. Marin, J.H. Ferrarezi, G.Vieira, D.C. Sass // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019. 35(5)
103. Ali M.R. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* from bacterial leaf spot disease of cucumber and evaluation of its biological control // Advances in BioResearch. 2018. Vol.9(3). pp.41-46.
104. Rudolph K. Infection of the Plant by *Xanthomonas* // Chapman and Hall, London. 1993. pp.193-264.
105. Иванцова Е.А. Болезни сои // Журнал «ФЕРМЕР. Черноземье». 2017. С. 43-44.

106. Punina N.V. Evaluation of the genetic diversity of ITS 16S-23S rRNA and *gyrB* gene and development of PCR diagnostics of plant pathogenic xantomonads / N.V. Punina, V.S. Zotov, B.B. Kuznetsov et al. // Bulletin of Moscow State Regional University. 2008. №2. pp. 3-17.
107. Егорова М.С., Игнатов А.Н., Мазурин Е.С. Диагностика нового бактериального патогена злаковых культур *Xanthomonas arboricola* методом ПЦР «в реальном времени» // Защита картофеля. 2014. №2. С. 35-39.
108. Доброзракова Т.Л. Сельскохозяйственная фитопатология, 2-е изд., испр. и доп. / Под ред. проф. М. К. Хохрякова. Л.: «Колос». 1974. 328 с.
109. Попкова К.В. Общая фитопатология: учебник для вузов. 2-е изд., перераб. и доп. // М.: Дрофа, 2005. 445 с.
110. Meenu G., Vikram A., Bharat N. Black rot - a devastating disease of crucifers: a review // Agriculture Reviews. 2013. Vol. 34. pp. 269–278.
111. Bila J. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 1 is the main causal agent of black rot of Brassicas in Southern Mozambique / J. Bila, C.N. Mortensen, M. Andresen et al. // African Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 12(6). pp. 602-610.
112. Watanabe M. Some properties of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* phage / M. Watanabe, K.W. Naito, K.W. Kaneko et al. // Annals of Phytopathological Society of Japan. 1980. Vol. 46. pp. 517-525.
113. Roohie R.K., Umesha S. Development of Multiplex PCR for the Specific Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Cabbage and Correlation with Disease Incidence // J Plant Pathol Microb. 2012. Vol3. pp. 4.
114. Лазарев А.М., Мысник Е.Н., Игнатов А.Н. Ареал и зона вредоносности сосудистого бактериоза капусты // Вестник защиты растений. 2017. №1(91). С. 52–55.
115. Stall R.E., Gottwald T.R., Koizumi M. Ecology of plant pathogenic xantomonads // Chapman & Hall, London. 1993. pp. 265–299.
116. Agrios G.N. Plant Pathology, 5th edn. // Oxford, UK: Elsevier Academic Press. 2005. 948 p.

117. Silva J. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of weeds / J. Silva, T. Silva Júnior, J. Soman et al. // Plant Pathology. 2017. Vol. 66(9)
118. Koenraad H. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Crucifer Seeds. / H. Koenraad, D. Hailstones, A. Ignatov et al. // APS PRESS. 2017. pp. 157-163
119. Miholančan M. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Croatia on Brassica spp. // Zastita Bilja. 2020. P.29
120. Hayward, A.C. Latent infection by bacteria // Ann. Rev. Phytopathol. 2003. Vol.12. pp. 87–97.
121. Castano J.J., Thurston H.D., Crowder L.V. Transmisio'n de gomosis en los pastos Micay e Imperial // Agr. Trop. 1964. Vol.20. pp. 379–387.
122. Пересыпкин В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. - 4-е изд., перераб. и доп // М.: Агропромиздат. 1989. 480 с.
123. Figaj D. The Role of Proteases in the Virulence of Plant Pathogenic Bacteria / D. Figaj, P. Ambroziak, T. Przepiora et al. // International Journal of Molecular Sciences. 2019. Vol.20(3). P.672
124. Tayi L. A mutation in an exoglucanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* that confers an endo mode of activity affects bacterial virulence but not the induction of immune responses in rice: Role of cellobiosidase in *Xanthomonas* virulence / L. Tayi, S. Kumar, R. Nathawat et al. // Molecular Plant Pathology.2017. Vol.19(6)
125. Tayi L. Identification of Pectin Degrading Enzymes Secreted by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and Determination of Their Role in Virulence on Rice / L. Tayi, R. Maku, H.K. Patel, R.V. Sonti // PLoS ONE. 2016. Vol.11(12):e0166396
126. Beaulieu C. Biochemical and genetic analysis of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pathovar *vesicatoria* / C. Beaulieu et al. // Mol. Plant-Microbe Interact. 1991. Vol.4. pp. 446–451.

127. Boher B. Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. / B. Boher et al. // *Phytopathology*. 1995. Vol.85. pp. 777–788.
128. Keshavarzi M. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis / M. Keshavarzi, S. Soyulu, I. Brown et al. // *Mol Plant Microbe Interact*. 2004. Vol.17(7). pp.805-815
129. Jacques M.-A. Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas* / M.-A. Jacques, M. Arlat, A. Castaing // *Annual Review of Phytopathology*. 2016. Vol.54. pp.163-187
130. Cerutti A. Immunity at cauliflower hydathodes controls infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / A. Cerutti, A. Jauneau, M.-C. Auriac et al. // *Plant physiology*. 2017. Vol.174(2). pp.01852.2016
131. Thakur A. Hypersensitive Responses in Plants / A. Thakur, S. Verma, V.P. Reddy // *Agricultural Reviews*. 2019. Vol.40. pp.113-120
132. Wang J.-C. Functional analysis and expressional regulation of *wxoE* and *wxoF* in lipopolysaccharide (lps) biosynthesis gene cluster I of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* / J.-C. Wang, T. Ulambayar, J.-G. Kim // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2011. Vol.75(3). pp.129-136
133. Romeiro R.S. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified bacterial elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* / R.S. Romeiro, O. Kimura // *J. Phytopathol*. 1997. Vol.14. pp. 495–498.
134. Pillay D. Electrophoretic and immunological analysis of lipopolysaccharides of *Xanthomonas albilineans* from three geographical regions / D. Pillay et al // *Lett. Appl. Microbiol*. 2008. Vol.21. pp. 210–214.
135. Romero A.M. First report of black rot on arugula caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Argentina / A.M. Romero, R. Zapata, M.S. Montecchia // *Plant Dis*. 2008. Vol.92. pp. 980.

136. Schaad N.W., Sitterly W.R., Humaydan H. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers // Plant Disease. 1980. Vol.64(1). pp. 91-92.
137. Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы: Учеб.- метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. G - 31 01 01 «Биология» // Мн.: БГУ, 2006. 116 с.
138. Rombouts S., Vaerenbergh J.V., Volckaert A. Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *porri* from leek in Flanders // Eur. J. Plant Pathol. 2016. Vol.144. pp. 185-198
139. Sijam K., Chang C.J., Gitaitis R.D. A medium for differentiating tomato and pepper strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* // Can. J. Plant Pathol. 2009. Vol.14. pp. 182–184.
140. Mhedbi-Hajri N. Evolutionary History of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas axonopodis* / N. Mhedbi-Hajri, A. Hajri, T. Boureau // PLoS ONE. 2013. Vol.8(3) pp.e58474
141. Hayward A.C. Isolation and characterization of *Xanthomonas* // Identification Methods for Microbiologists. 1979. pp. 15–32.
142. Pruvost O. New media for the semiselective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot / O. Pruvost, P. Roumagnac, C. Gaube et al. // Journal of Applied Microbiology. 2005. Vol.99(4). pp.803-815.
143. Dutta B. Distribution of phytopathogenic bacteria in infested seeds / B. Dutta, C. Block, K. Stevenson et al. // Seed Science and Technology. 2013. Vol.41(41). pp.1-15
144. Gitaitis R.D. A differential medium for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and other cellulolytic xanthomonads from various natural sources / R.D. Gitaitis et al. // Plant Dis. 1991. Vol.75. pp. 1274–1278.
145. Иконникова Н.В. Бактериофаги – вирусы бактерий: учеб. пособие // Минск: ИВЦ Минфина. 2017. 41 с.

146. Hausler T. Viruses vs Superbugs: a solution to the antibiotics crisis? // New York: MacMillan. 2008. 299 p.
147. Pirnay J.P. Vos D.D., Verbeken G. The phage therapy paradigm: Prêt-à-porter or sur-mesure? // Pharm. Res. 2011. Vol.28. pp. 934–937.
148. Matsuzaki S. Perspective: The age of the phage / S. Matsuzaki et al. // Nature. 2014. Vol.509. pp.9
149. Jones J.B., Jackson L.E., Balogh B. Bacteriophages for plant disease control // Annual Review of Phytopathology. 2007. Vol.45. pp. 245-262.
150. Jones, J.B. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J.B. Jones et al.// Bacteriophage. 2012. Vol.2. pp. 208–214.
151. Васильев Д.А. Разработка методов фагоидентификации и фагодетекции бактерий *Pseudomonas fluorescens* / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, А.М. Артамонов, Т.А. Гринева, Е.А. Ляшенко // Фундаментальные исследования. 2014. №5-1. С.55-58.
152. Alisky J., Iczkowski K., Rapport A. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents // J Infect, 1998. Vol.36. pp. 5-15
153. Бондаренко В.М. Клинический эффект и пути рационального использования лечебных бактериофагов в медицинской практике // Приложение к Журналу инфектологии. 2011. №3(3). С.15-19
154. Бактериофаги (строение, свойства, практическое применение). Учебно-методическое пособие для студентов [Текст] / Под ред. Поздеев О.К., Федорова Е.Р., Валеева Ю. В. Казань: КГМУ. 2012. 50 с.
155. Ковалева Е.Н., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Бактериофаги *Enterococcus* и перспективы их практического применения в ветеринарии // Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел: материалы Международной научно-практической конференции. 2008. С. 333-336.
156. Каттер Э., Сулакведзе А. Бактериофаги: биология и практическое // М.: Научный мир. 2012. 636 с.

157. Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Анталогия научно-методических материалов по изучению бактериофагов // Ульяновск.УГСХА. 2017. 228 с.
158. Civerolo E.L. Comparative relationships between two *Xanthomonas pruni* bacteriophages and their bacterial host // *Phytopathology*. 1970. Vol.60. pp. 1385-1388.
159. Balogh B., Jones J.B. Phage therapy for plant disease control // *Iriarte Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010. Vol.11. pp. 48–57.
160. Тимаков В.Д., Гольдфарб Д.М. Экспериментальное обоснование нового принципа обнаружения дизентерийных и брюшнотифозных бактерий с помощью фага // *ЖМЭИ*. 1956. № 10. С. 3-7.
161. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биол.наук / Ульяновск, 2007. 39 с.
162. Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Фагоидентификация бактерий *Escherichia coli* 0157 // *Инфекция и иммунитет*, 2014. №5. С.98.
163. Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Индикация бактерий рода *Citobacteres* с помощью реакции нарастания титра фага (РНФ) // *Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*, 2013. №1(21). С.60-64
164. Сульдина Е.В. Выделение бактериофагов *Y. enterocolitica* и селекция клонов / Е.В. Сульдина, Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Золотухин С.Н. // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. Журн*, 2017. № 7(37)
165. Ляшенко Е.А., Садртдинова Г.Р., Васильев Д.А. Сравнительный анализ биологических свойств бактериофагов бактерий *Klebsiella pneumonia* // *Инфекция и иммунитет*, 2014. №5. С.94-95

166. Феоктистова Н.А. Биологические свойства бактериофагов *Bacillus mycoides* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, Д.А. Васильев, А.В. Алешкин // Инфекция и иммунитет, 2014. №5. С.118-120.
167. Liew K.W., Alvarez A.M. Biological and morphological characterization of *Xanthomonas campestris* bacteriophages // *Phytopathology*. 1981. Vol.71. pp. 269-273.
168. Hung C.-H. Involvement of tonB-exbBD1D2 operon in infection of *Xanthomonas campestris* phage ϕ L7 / C.-H. Hung, C.-F. Yang, C.-Y. Yang, Y.-H. Tseng // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003. Vol.302(4). pp.878-884
169. Bacteriophages: A new weapon for the control of bacterial blight disease in rice caused by *Xanthomonas oryzae* / P. Ranjani et al. // *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 2018. Vol.46(4). pp. 346–359.
170. Gašić K., Ivanovic M.M., Ignjatov M. Isolation and characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages // *Journal of Plant Pathology*. 2011. Vol. 93. pp. 415-423.
171. Ackermann H.W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000 // *Archives of Virology*, 2001. Vol. 146. pp. 843-857.
172. Aprea G. Bacteriophage Morphological Characterization by Using Transmission Electron Microscopy / G. Aprea, A.R. D'Angelo, V.A. Prencipe // *Journal of Life Sciences*. 2015. Vol.9. pp.214-220
173. Weiss B.D. Capage M.A., Kessel M. Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // *Journal of bacteriology*. 1994. pp. 3354-3359
174. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина Л.П. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологического исследования // М.: «Медицина». 2004. 576 с.
175. Васильев Д.А., Швиденко И.Г., Золотухин С.Н. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии // Ульяновск. 2016. 152 с.

176. Викторов Д.А., Артамонов А.М., Васильев Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* // Ветеринария и кормление. 2012. №5. С. 8-9.

177. Васильев Д.А., Викторов Д.А., Богданов И.И. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб // Естественные и технические науки. 2011. №2(52). С. 79-82.

178. Викторов Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida*: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Саратов. 2011. 22 с.

179. Викторов Д.А., Васильев Д.А. Применение реакции нарастания титра фага для индикации патогенных псевдомонад // Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине: Материалы II-ой конференции молодых ученых. 2012. С. 108-111.

180. Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd edition // APS Press , St Paul, MN. 2001. 546 p.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)
ВСЕРОССИЙСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ



VKM
VKM

Адрес: 142290 г.Пушино, Московская обл., просп. Науки, д.5
Тел.: (4967) 73-09-24; **Тел./Факс:** (495) 956-33-70
E-mail: vkm@ibpm.pushchino.ru

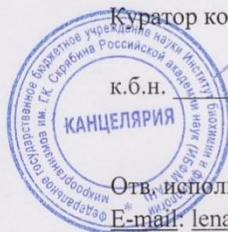
Информация о предоставляемом образце микроорганизма

- 1. Тип образца:** штамм бактерии
- 2. Название штамма** (цитирование в публикациях и патентах):
Xanthomonas campestris VKM В-570 или *Xanthomonas campestris* VKM В-570.
- 3. Название вида:** *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 emend. Vauterin et al. 1995
- 4. Основная литература по номенклатуре и таксономическому описанию вида:** см. <http://www.bacterio.net/>
- 5. Среда для культивирования:** среда глюкозо-дрожжевой агар (среда № 112 в Каталоге VKM, см. сайт <http://www.vkm.ru>). **Состав:** глюкоза 20.0 г, дрожжевой экстракт 10.0 г, СаСО₃ 20.0 г, агар 17.0 г, дистиллированная вода 1000.0 мл. Стерилизовать среду при 111 С, 30 мин.
- 6. Условия культивирования:** 28° С, аэробно.
- 7. Информация о биологической опасности (безопасности):** вид *Xanthomonas campestris* не значится в списках 1-4 групп патогенности (Приложение 1 «Классификация микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний...» к Санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами», в ред. Дополнений и изменений N 2, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.06.2011 N 86).
- 8. Состояние предоставляемого образца:** лиофильно-высушенная культура в ампуле.

Куратор коллекции бактерий VKM ИБФМ РАН,

к.б.н.

/Кудряшова Е.Б./



Отв. исполнитель: к.б.н. Арискина Е.В.

E-mail: lana@ibpm.pushchino.ru

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)
ВСЕРОССИЙСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ



VKM
VKM

Адрес: 142290 г.Пушино, Московская обл., просп. Науки, д.5
Тел.: (4967) 73-09-24; **Тел./Факс:** (495) 956-33-70
E-mail: vkm@ibpm.pushchino.ru

Информация о предоставляемом образце микроорганизма

- 1. Тип образца:** штамм бактерии
- 2. Название штамма** (цитирование в публикациях и патентах):
Xanthomonas campestris ВКМ В-610 или *Xanthomonas campestris* VKM В-610.
- 3. Название вида:** *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 emend. Vauterin et al. 1995
- 4. Источник выделения штамма:** рапс, *Brassica napus*.
- 5. Основная литература по номенклатуре и таксономическому описанию вида:** см.
<http://www.bacterio.net/>
- 6. Среда для культивирования:** среда глюкозо-дрожжевой агар (среда № 112 в Каталоге ВКМ, см. сайт <http://www.vkm.ru>). **Состав:** глюкоза 20.0 г, дрожжевой экстракт 10.0 г, СаСО₃ 20.0 г, агар 17.0 г, дистиллированная вода 1000.0 мл. Стерилизовать среду при 111 С, 30 мин.
- 7. Условия культивирования:** 28° С, аэробно.
- 8. Информация о биологической опасности (безопасности):** вид *Xanthomonas campestris* не значится в списках 1-4 групп патогенности (Приложение 1 «Классификация микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний...» к Санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами», в ред. Дополнений и изменений N 2, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.06.2011 N 86).
- 9. Состояние предоставляемого образца:** лиофильно-высушенная культура в ампуле.

Куратор коллекции бактерий ВКМ ИБФМ РАН,



к.б.н. _____ /Кудряшова Е.Б./

Отв. исполнитель: к.б.н. Арискина Е.В.

E-mail: lena@ibpm.pushchino.ru

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)
ВСЕРОССИЙСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ



VKM
VKM

Адрес: 142290 г.Пушино, Московская обл., просп. Науки, д.5
Тел.: (4967) 73-09-24; **Тел./Факс:** (495) 956-33-70
E-mail: vkm@ibpm.pushchino.ru

Информация о предоставляемом образце микроорганизма

- 1. Тип образца:** штамм бактерии
- 2. Название штамма** (цитирование в публикациях и патентах):
Xanthomonas campestris ВКМ В-611 или *Xanthomonas campestris* VKM В-611.
- 3. Название вида:** *Xanthomonas campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939 emend. Vauterin et al. 1995
- 4. Основная литература по номенклатуре и таксономическому описанию вида:** см. <http://www.bacterio.net/>
- 5. Среда для культивирования:** среда глюкозо-дрожжевой агар (среда № 112 в Каталоге ВКМ, см. сайт <http://www.vkm.ru>). **Состав:** глюкоза 20.0 г, дрожжевой экстракт 10.0 г, СаСО₃ 20.0 г, агар 17.0 г, дистиллированная вода 1000.0 мл. Стерилизовать среду при 111 С, 30 мин.
- 6. Условия культивирования:** 28° С, аэробно.
- 7. Информация о биологической опасности (безопасности):** вид *Xanthomonas campestris* не значится в списках 1-4 групп патогенности (Приложение 1 «Классификация микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний...» к Санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами», в ред. Дополнений и изменений N 2, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.06.2011 N 86).
- 8. Состояние предоставляемого образца:** лиофильно-высушенная культура в ампуле.

Куратор коллекции бактерий ВКМ ИБФМ РАН,

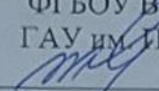
к.б.н.

/Кудряшова Е.Б./



Отв. исполнитель: к.б.н. Арискина Е.В.

E-mail: lena@ibpm.pushchino.ru

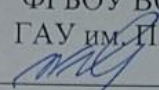
УТВЕРЖДАЮ:
Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «Ульяновская
ГАУ им. П.А. Столыпина»

И.И. Богданов
«___» _____ 2020 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОСОБЕННОСТЯМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ, ОЧИСТКИ И
КОНЦЕНТРАЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ
БАКТЕРИЙ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS*

Ульяновск 2020

УТВЕРЖДАЮ:

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «Ульяновская
ГАУ им. П.А. Столыпина»
 И.И. Богданов
«___» _____ 2020 г.

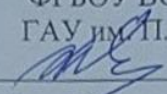
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО УСКОРЕННОЙ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *XANTHOMONAS*
SAMPESTRIS PV. SAMPESTRIS МЕТОДОМ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ
ТИТРА ФАГА В ОБЪЕКТАХ САНИТАРНОГО НАДЗОРА

Ульяновск 2020

УТВЕРЖДАЮ:

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «Ульяновская
ГАУ им. П.А. Столыпина»


И.И. Богданов
« » 2020 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *XANTHOMONAS*
SAMPESTRIS PV. SAMPESTRIS ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА И
ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ
СПЕЦИФИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА Кл34-УлГАУ.

Ульяновск 2020

