

УДК 579

DOI 10.18286/1816-4501-2020-1-60-64

ОСНОВНЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ БОРЬБЫ С ВОЗБУДИТЕЛЕМ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ

Майоров Павел Сергеевич, соискатель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, Ульяновская область, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1, тел.: +7 (8422) 55-95-35

e-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

Ключевые слова: бактериофаги, *Xanthomonas campestris pv. campestris*, биопрепарат, технологические параметры, фитопатоген.

В статье представлены результаты подбора основных технологических параметров для изготовления биопрепарата на примере бактериофага *Xanthomonas campestris pv. campestris* Кл34-УлГАУ. Были проведены эксперименты, направленные на определение наилучшего способа очистки бактериофага от производственной культуры бактерий, среди которых выделялись воздействие температурой и трихлорметаном, а также фильтрация суспензии через мембранные фильтры с различной величиной пор. Установлено, что очистка суспензии от бактериальных клеток путем фильтрации через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм оказалась наилучшим способом очистки. Было установлено оптимальное время пассажа при изготовлении фагового препарата, которое составило 24 ч. При данном времени было получено оптимальное соотношение результата (литическая активность бактериофага) и затрачиваемого времени. Подбор оптимального соотношения фага и бактериальной культуры для культивирования показал, что наилучшим являются соотношения 1:2 и 1:3. При данных параметрах были получены схожие результаты. В качестве оптимальной температуры культивирования бактериофага установлена температура 20 - 32 °С, при которой сохраняется активность бактериофага.

Введение

Бактериальные болезни растений являются одной из основных причин потери урожая в сельском хозяйстве, поскольку в настоящее время нет эффективных средств борьбы с ними. Сосудистый бактериоз крестоцветных, вызываемый бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris*, поражает практически все известные растения, относящиеся к семейству Крестоцветные. [1, 2]. Стандартные методы борьбы с данным заболеванием не обеспечивают удовлетворительного контроля заболеваний, особенно когда погодные условия благоприятствуют распространению возбудителя [3, 4, 5].

Растения, относящиеся к семейству Кре-

стоцветные, 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 и корневую систему. Данные бактерии приводят к закупориванию сосудов растения, 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

Таблица 1

Зависимость титра бактериофага КлЗ4-УлГАУ 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 КлЗ4-УлГАУ, БОЕ/мл	1,2x107± 0,2x107	1,1x108± 0,2x108	1,4x108± 0,1x108	1,2x107± 0,2x107	1,5x106± 0,1x106

листьев. Болезнь способна прогрессировать в период хранения, что приводит к потерям урожая [6, 7, 8].

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 [9, 10].

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 [11, 12]. Фагодиагностика как один из методов индикации и идентификации позволяет быстро и точно определить принадлежность исследуемой бактерии не только к определенному роду, но и к виду и даже фаговару [13, 14]. При этом немаловажным является правильный подбор бактериофагов, входящих в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, что требует их тщательного изучения и определения оптимальных параметров взаимодействия фаг-бактерия с целью минимизации развития их резистентности бактерий используемым бактериофагам [15].

В связи с этим целью исследования являлся подбор оптимальных технологических параметров изготовления биопрепарата на основе ранее выделенных бактериофагов [16].

Объекты и методы исследований

Объектом исследования являлся бактериофаг *X. campestris pv. campestris* КлЗ4-УлГАУ, выделенный из образцов капусты с признаками поражения от сосудистого бактериоза с полей Ульяновской области. В качестве производственного использовали штамм бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2, который обладал типичными для данного вида бактерий свойствами, а также обладал наилучшими показателями роста в течение 24 часов (до 1,6x10⁸ м.к./мл).

Питательные среды и реактивы: агар бактериологический (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), пептон сухой ферментативный (HiMedia), триптон (HiMedia), экстракт дрожжевой (HiMedia), среда LB (триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl - 10 г/л), хлорид натрия (ООО «УлХим»), глюкоза (HiMedia).

Приборы и оборудование: лабораторная бактериологическая посуда, водяная баня, термометр ртутный, дистиллятор, шкаф сушильно-стерилизационный ШСС – 80, автоклав ГК-100-3, холодильники минусовые и бытовые, термостат ТС-80М-2.

Исследования проводились на основе стандартных, а также модифицированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им П.А. Столыпина методик [11, 12].

Результаты исследований

Основными технологическими параметрами изготовления и контроля фаговых биопрепаратов являются такие показатели, как количественное соотношение фага и бактериальной культуры, оптимальное соотношение между временем пассажа и активностью фага, температура культивирования.

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 по 5 пробирок). После этого в пробирки вносили производственную культуру бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2 при концентрации 10⁷-10⁸ 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 Грациа (табл. 1).

По результатам проведенных исследований установлено, что наиболее оптимальным соотношением фага и производственной культуры бактерий для исследуемых бактериофа-

Таблица 2
Зависимость титра бактериофага Кл34-УлГАУ от времени пассажа

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

Таблица 3
Оптимальные температурные показатели культивирования бактериофага Кл34-УлГАУ в течение 24 часов

Объект	Температура культивирования фага						
	12 °C	16 °C	20 °C	24 °C	28 °C	32 °C	36 °C
	Наличие лизиса						
Фаг Кл34-УлГАУ	-	-	+	+	+	+	-
	Наличие роста						
Культура бактерий <i>X. campestris pv. campestris</i> Хс2	-	+	+	+	+	+	-

гов являются 1:2 и 1:3, о чем свидетельствуют представленные в таблице 1 данные. При данных соотношениях фага и бактериальной культуры были получены практически идентичные результаты. В качестве оптимального производственного параметра было выбрано соотношение фага и бактериальной культуры 1:2, поскольку при получении схожих результатов данное соотношение позволяет снизить расход питательных сред по сравнению с соотношением 1 : 3 в 1,5 раза.

Следующий этап наших исследований был посвящен определению оптимального соотношения между временем пассажа и активностью бактериофага, для чего в пробирки с жидкой питательной средой LB в объеме 4,5 мл добавляли по 0,4 мл производственной культуры бактерий *X. campestris pv. campestris* Хс2 и 0,2 мл исследуемого бактериофага. 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 ч ± 0,3 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 (табл. 2).

По результатам проведенных исследований установлено, что в среднем оптимальное время культивирования исследуемых бактериофагов при температуре 28 °С находится в пределах 24-28 часов. На примере бактериофага Кл34-УлГАУ (табл.2) видно, что в данном диапазоне значительного изменения литической активности не происходит, в связи с чем в качестве технологического параметра при изготовлении фагового препарата считаем время пассажа 24 ч. Отметим, что при культивировании свыше 32 часов наблюдается снижение литической активности бактериофага.

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 0,4 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 на возможность роста при заданных условиях и бактериофага на чистоту. 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 3. Наличие лизиса определяли по отсутствию помутнения среды.

Проведенные исследования показали, что диапазон оптимальной температуры культивирования исследуемых бактериофагов в большинстве случаев находится в пределах 20 – 28 °С. Так, бактериофаг Кл34-УлГАУ показал положительный результат в диапазоне температур 20 – 32 °С. Отметим, что после культивирования пробирок при 12 °С помимо отсутствия помутнения в исследуемых пробирках, в контрольных его также не наблюдалось, что свидетельствовало об отсутствии роста культуры при данных температурных параметрах.

На основе подобранных параметров производится изготовление биопрепарата путем культивирования бактериофага КлЗ4-УлГАУ на жидкой питательной среде LB с производственной культурой *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Хс2.

Обсуждение

Применение методов индикации и идентификации бактериальных возбудителей болезней растений, защиты от них, основанные на применении бактериофаговых биопрепаратов, является одной из привлекательных альтернатив существующим методам (молекулярным, химическим и т.д.). Бактериофаги представляют собой вирусы, которые специфически заражают бактерии, их репликация приводит к лизису их бактериального хозяина и высвобождению вновь образованных фаговых частиц. Фаготерапия успешно применяется в ветеринарной и медицинской практиках, однако практически не используется в отношении бактерий, возбудителей болезней растений, в том числе *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Данное направление приобретает все больший интерес у исследователей вследствие повышения внимания к безопасности и экологической составляющей производимой сельскохозяйственной продукции. Полученные результаты будут использованы при производстве опытных образцов биопрепарата и его практическом применении.

Заключение

Проведенные исследования показали, что в качестве оптимального времени пассажа при изготовлении фагового препарата можно считать 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 рекомендуемой при выращивании бактерий *X. campestris* pv. *campestris*, в том числе производственного штамма Хс2.

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

Библиографический список

1. 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.
2. 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. – P. 298-305.
3. 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, No 2. – P. 147-160.
4. 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). – 2007. - URL: <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-019a-2014.pdf>
5. Biological control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with Bacillus strains / S. M. S. Massomo [et al.] // J. Phytopathol. – 2004. – Vol. 152. – P. 98–105.
6. Монахос, Г. Ф. Проявление симптомов сосудистого бактериоза у капустных растений с различными генами устойчивости в зависимости от концентрации инокулюма *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / Г. Ф. Монахос, Во Тхи Нгок Ха, Ф. С. Джалилов // Известия ТСХА. – 2015. - № 1. – С. 26-34.
7. Bio-based products control black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and increase the nutraceutical and antioxidant components in kale / M. P. Andrés [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – P. 11.
8. *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). - P. 602-610.
9. Phages in nature / M. R. Clokie [et al.] // Bacteriophage. – 2011. – Vol. 1. – P. 31–45.
10. Characterization of lytic bacteriophage

XCC9SH3 infecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / M. S. Renu, U. B. Bhojar, Singh [et al.] // *Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 99 (1). – P. 233-238.

11. Алгоритм фаготипирования бактерий *Bacillus cereus* / А. И. Калдыркаев, Д. А. Васильев, Н. А. Феоктистова [и др.] // *Агробизнес и экология*. - № 2 (2). - С. 166-169.

12. Feoktistova, N. A. Modification of method of *Bacillus anthracis* setting phage indication in samples of soil / N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev, C. N. Zolotukhin // *Asian journal of microbiology, biotechnology and environmental sciences*. – 2018. – Vol. 3, No 20. – P. 734-737.

13. Чугунова, Е. О. Применение бактериофагов для детекции бактерий (обзор литературы) / Е. О. Чугунова, Н. А. Татарникова // *Пермский аграрный вестник*. - 2016. - № 4 (16). - С. 121-126.

14. 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). – P. 346–359.

15. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. B. Jones [et al.] // *Bacteriophage*. – 2012. – Vol. 2. – P. 208–214.

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

17. 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.

THE MAIN TECHNOLOGICAL PARAMETERS OF PRODUCING BIOPREPARATION FOR CONTROL OF THE BLACK ROT AGENT OF CRUCIFEROUS

Mayorov P. S., Feoktistova N. A., Vasiliev D. A.

FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

432017, Ulyanovsk region, Ulyanovsk, Novy Venetz boulevard, 1, tel.: +7 (8422) 55-95-35

e-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

Key words: bacteriophages, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, biopreparation, technological parameters, phytopathogene.

The article presents the results of selecting the main technological parameters for the production of biopreparation on the example of the bacteriophage *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* KI34-Ulgau. Experiments were carried out to determine the best way to purify bacteriophage from the bacteria production culture, among which were temperature effect and trichloromethane, as well as filtration of the suspension through membrane filters with different pore sizes. It was established that cleaning suspension from bacterial cells by filtering through membrane filters with a pore size of 0.22 microns was the best way to clean it. The optimal passage time for the production of phage preparation was established, which was 24 hours. At this time, the optimal ratio of the result (lytic activity of bacteriophage) and the time spent was obtained. Selection of optimal ratio of phage and bacterial culture for cultivation showed that the best ratios are 1:2 and 1:3. Similar results were obtained for these parameters. The optimal culture temperature of the bacteriophage is set at a temperature of 20-32 °C, at which activity of the bacteriophage is saved.

References

17. 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.
18. 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. – P. 298-305.
19. 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, No 2. – P. 147-160.
20. ISTA. 7-019 Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. (Prepared by Roberts, S.J. and Koenraad, H.) International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods, Bassersdorf, Switzerland, International Seed Testing Association (ISTA). – 2007. - URL: <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-019a-2014.pdf>
21. Biological control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains / S. M. S. Massomo [et al.] // *J. Phytopathol*. – 2004. – Vol. 152. – P. 98–105.
22. Monakhos, G. F. Symptoms of vascular bacteriosis in cabbage plants with different resistance genes depending on the concentration of inoculum *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / G. F. Monakhos, Vo Tkhii Ngok Ha, F. S. Dzhaliilov // *Isvestiya TAA*. – 2015. - № 1. – P. 26-34.
23. Bio-based products control black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and increase the nutraceutical and antioxidant components in kale / M. P. Andrés [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 11.
24. *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). - P. 602-610.
25. Phages in nature / M. R. Clokie [et al.] // *Bacteriophage*. – 2011. – Vol. 1. – P. 31–45.
26. Characterization of lytic bacteriophage XCC9SH3 infecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / M. S. Renu, U. B. Bhojar, Singh [et al.] // *Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 99 (1). – P. 233-238.
27. Algorithm of bacteria phage typing *Bacillus cereus* / A. I. Kaldyrkayev, D. A. Vasilyev, N. A. Feoktistova [et al.] // *Agrobusiness and ecology*. - № 2 (2). - P. 166-169.
28. Feoktistova, N. A. Modification of method of *Bacillus anthracis* setting phage indication in samples of soil / N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev, C. N. Zolotukhin // *Asian journal of microbiology, biotechnology and environmental sciences*. – 2018. – Vol. 3, No 20. – P. 734-737.
29. Chugunova, E. O. Appliance of bacteriophages for bacteria detection (literature review) / E. O. Chugunova, N. A. Tatarnikova // *Perm agrarian vestnik*. - 2016. - № 4 (16). - С. 121-126.
30. 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). – P. 346–359.
31. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. B. Jones [et al.] // *Bacteriophage*. – 2012. – Vol. 2. – P. 208–214.
32. Mayorov, P. S. Development of scheme for bacteriophages allocation *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* / P. S. Mayorov, N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev // *Modern science : actual problems of theory and practice Series : Natural and technical Sciences*. – 2019. - № 6. – P. 20-25.