

**ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И КОНТРОЛЯ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА
*XANTHOMONAS CAMPESTRIS***

Майоров Павел Сергеевич, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

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

Майоров Олег Сергеевич, магистрант кафедры «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.

Традиционные методы борьбы с бактериальными заболеваниями растений, в том числе сосудистым бактериозом Крестоцветных в настоящее время не позволяют добиться эффективного результата, что помимо прочего связано со способностью фитопатогенов приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды. Применение бактериофагов в качестве антибактериальных агентов является перспективным и эффективным направлением в области защиты растений. Целью исследования являлась разработка технологии изготовления и контроля фагового биопрепарата *Xanthomonas campestris* с учетом ранее определенных технологических параметров. Объектами исследования являлся бактериофаг *X. campestris* pv. *campestris* Кл34-УлГАУ, выделенный из образцов капусты с признаками поражения от сосудистого бактериоза с полей Ульяновской области, Старомайнского района. В качестве производственного использовали штамм бактерий *X. campestris* pv. *campestris* Хс2. Авторами были проведены исследования по подбору оптимальных условий с учетом определенных ранее параметров: способа очистки бактериофага от производственной культуры бактерий, оптимального времени пассажа при изготовлении фагового препарата, оптимального соотношения фага и бактериальной культуры для культивирования, оптимальной температуры культивирования бактериофага. В работе предложена схема изготовления и контроля фагового биопрепарата *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, состоящая из 4 этапов: пробоподготовка производственной культуры бактерий на соответствие свойств заявленному штамму, пробоподготовка производственного штамма бактериофага Кл34-УлГАУ на соответствие его активности после хранения, изготовление фагового препарата с учетом масштабирования производства, розлив, контроль чистоты, внешнего вида, титра бактериофага, его специфичности и спектра литического действия, хранение биопрепарата.

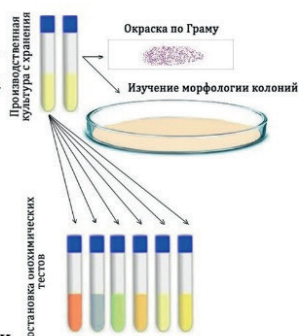
Введение

Сосудистый бактериоз, вызываемый бактериями *Xanthomonas campestris*, наносит серьезный урон культурным растениям, относящимся к семейству Крестоцветные [1-4]. Поскольку существующие методы борьбы с заболеванием часто не позволяют добиться удовлетворительного результата, эффективным вариантом антибактериального средства становятся

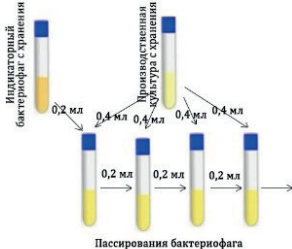
фаговые биопрепараты [5 - 7].

Применение бактериофагов в качестве антибактериальных средств помимо медицины в настоящее время также используется для защиты пищевых продуктов и воды от бактериальной порчи или загрязнения [8 - 10]. Помимо этого бактериофаги эффективно применяются для защиты сельскохозяйственных культур от фитопатогенных бактерий [11 - 13].

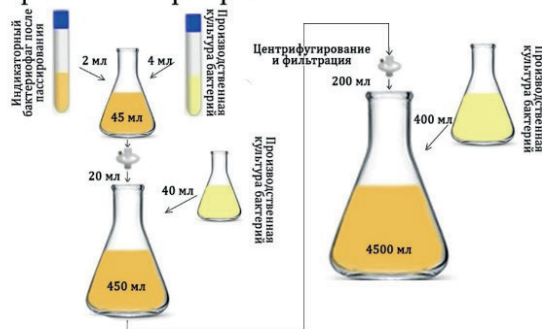
I Проверка соответствия производственного штамма по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам



II Изучение активности индикаторного бактериофага после хранения и его



III Изготовление фагового биопрепарата



IV Розлив, контроль и хранение биопрепарата

Условия хранения и срок годности - при температуре 2-4 °С в течение 12 месяцев



Контроль осуществляется по следующим показателям:

- внешний вид
- чистота биопрепарата
- титр бактериофага
- специфичность
- спектр литического действия

Рис. 1 - Технология изготовления и контроля биопрепарата на основе бактериофага Кл34-УлГАУ

В связи с этим целью исследования являлась разработка технологии изготовления и контроля фагового биопрепарата активного в отношении *Xanthomonas campestris* с учетом ранее определенных технологических параметров [14].

Материалы и методы исследований

В качестве объекта исследования использовали выделенный ранее бактериофаг

Кл34-УлГАУ, активный в отношении бактерий *X. campestris* pv. *campestris*. Культуру бактерий *X. campestris* pv. *campestris* Хс2 использовали в качестве производственного штамма. Данный штамм обладает типичными свойствами для данного вида бактерий и хорошими показателями роста в течение 24 часов (до 10^8 м.к./мл) [15].

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

Приборы и оборудование: лабораторная бактериологическая посуда, термометр ртутный, водяная баня, шкаф сушильно-стерилизационный, дистиллятор, холодильник бытовой, автоклав, термостат ТС-80М-2.

Методической основой для проведения исследований стали имеющиеся и апробированные наработки сотрудников кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [16, 17].

Результаты исследований

При изготовлении биопрепарата для культивирования отобранного бактериофага использовали жидкую питательную среду LB с суточной культурой бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

На первом этапе изготовления проводится проверка производственного штамма на соответствие бактериям *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Для этого изучаются его морфологические, культуральные и биохимические свойства и проверяется соответствие следующим требованиям: прямые грамотрицательные палочки, подвижные, не образующие индола и продукции ацетона, проявляющие амилолитическую активность, разжижающие желатин, имеющие отрицательную реакцию с метил-рот, ферментирующие сахарозу и глюкозу, выделяющие сероводород и не ферментирующие сорбит и лактозу. Начальный титр производственного штамма составляет не менее 10^8 м.к./мл.

Далее изучается литическая активность бактериофага Кл34-УлГАУ после хранения к производственному штамму Хс2. Для этого на газон производственной культуры бактерий наносится 0,1 мл бактериофага. Чашки наклоняют для их распределения по площади газона и инкубируют в течение 24 часов при температуре 28 °С. Параллельно с этим ставится контроль в виде

Таблица 1

Технологические параметры изготовления фагового биопрепарата

Технологический параметр	Значение
Производственный штамм	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> Xc2
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

стерильного бактериологического бульона с внесенным 0,1 мл бактериофага. Чувствительность производственного штамма к исследуемому бактериофагу определяется по наличию зон лизиса в местах нанесения бактериофага на газон производственной культуры и отсутствию роста в контрольном образце. Затем проводится пассирование бактериофага Кл34-УлГАУ по предложенной ранее схеме [15]. В зависимости от степени активности бактериофага после хранения осуществляется 4-7 пассажей.

На третьем этапе, с учетом предложенных ранее параметров, проводится изготовление и масштабирование производства биопрепарата. Для удобства производства лабораторной партии биопрепарата было предложено проводить его в 3 стадии, позволяющих эффективно провести масштабирование объемов.

Обобщенные технологические параметры представлены в таблице 1. Технология изготовления и контроля биопрепарата на основе отобранного бактериофага представлена на рисунке 1.

1 стадия. 2 мл бактериофага в концентрации 10^8 БОЕ/мл вносятся в 45 мл питательной среды LB. Затем туда же вносится 4 мл суточной культуры бактерий *X. campestris* Xc2. Параллельно с этим ставится контроль в виде 2 пробирок, содержащих 4,5 мл среды LB, в которую в одном случае внесли 0,4 мл производственной культуры бактерий, в другую - 0,2 мл бактериофага. Посевы инкубируют при температуре 28°C в течение 24 часов. Результат учитывается при визуальном осмотре – производственная колба должна оставаться прозрачной, контрольная пробирка с бактериофагом также остается прозрачной, в пробирке с бактериальным штаммом наблюдается помутнение среды. Полученную суспензию бактериофагов подвергают центрифугированию при 3000 об/мин и фильтрации с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм и определяют их литиче-

скую активность. Затем приступают ко второй стадии производства.

2 стадия. 20 мл бактериофага, полученного по результатам первой стадии, в концентрации 10^8 БОЕ/мл вносятся в 450 мл питательной среды LB. Затем туда же вносится 40 мл суточной культуры бактерий *X. campestris* Xc2. Постановка контролей проводится аналогично с постановкой на первой стадии. Посевы инкубируют в течение 24 часов при температуре 28°C. Полученную суспензию бактериофагов подвергают центрифугированию при 3000 об/мин и фильтрации с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм и определяют их литическую активность. Затем приступают к третьей стадии производства.

3 стадия. 200 мл бактериофага, полученного по результатам второй стадии, в концентрации 10^8 БОЕ/мл вносятся в 4,5 л питательной среды LB. Затем туда же вносится 400 мл суточной культуры бактерий *X. campestris* Xc2. Постановка контролей проводится аналогично с постановкой на первой стадии. Посевы инкубируют в течение 24 часов при температуре 28°C. Полученную суспензию бактериофагов подвергают центрифугированию при 3000 об/мин и фильтрации с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм. Проводится заключительное определение литической активности очищенных бактериофагов.

На заключительной стадии производства проводится розлив наработанного фагового биопрепарата в стерильные флаконы различного объема (в зависимости от целей применения). Каждый флакон с разлитым биопрепаратом маркируется. Флаконы фасуются по 10 штук в упаковку с приложенной инструкцией по методике применения биопрепарата.

Проводится итоговая оценка качества фасованного биопрепарата на соответствие заданным свойствам, для чего производится отбор не менее 10 случайных флаконов из одной партии. 5 из ото-

бранных флаконов используются для определения стерильности биопрепарата, внешнего вида, специфичности, титра бактериофага и спектра литического действия. Остальные 5 флаконов помещаются в архив на срок не менее 18 месяцев.

Хранение биопрепарата производят при следующих параметрах: температура 2-4 °С, относительная влажность не более 80%. Установленный срок сохранения заданных при производстве параметров биопрепарата составляет не менее 12 месяцев.

Обсуждение

Бактериальные инфекции в настоящее время за счет негативного воздействия на различные сельскохозяйственные культуры наносят значительный ущерб занятым в сфере растениеводства предприятиям, особенно с учетом появления новых штаммов, устойчивых к действию традиционных средств борьбы с ними. Бактериофаги позволяют бороться с фитоинфекциями, вызванными такими бактериями, более эффективно, а также создавать специальные, дешевые и стабильные средства для обнаружения бактерий. В данной работе представлены результаты изучения бактериофагов *X. campestris* и возможности их практического применения. Приведенные параметры позволяют производить лабораторные серии биопрепаратов на основе выделенного бактериофага с целью индикации бактерий *X. campestris* в объектах окружающей среды. Потенциально возможно применение разработанного биопрепарата и как средства для профилактики и борьбы с данным фитопатогеном.

Заключение

Проведенные исследования показали, что представленная схема изготовления и контроля позволяет эффективно нарабатывать необходимое количество фагового биопрепарата. Представлены основные этапы изготовления и контроля фагового биопрепарата, включающие пробоподготовку производственной культуры бактерий и производственного штамма бактериофага КлЗ4-УлГАУ, изготовление фагового препарата с учетом масштабирования производства, розлив, контроль и хранение биопрепарата.

Представленная схема используется для производства фагового биопрепарата в лабораторных условиях, однако возможна ее доработка и для широкомасштабного производства, поскольку отработаны основные параметры ее применения. В процессе проведения исследований было установлено высокое качество производимого фагового биопрепарата, отвечающего установленным показателям стерильности, специфичности, титра

бактериофага и спектра его литического действия.

Библиографический список

1. 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.
2. Balogh, B. Phage Therapy for Plant Disease Control / B. Balogh, J. Jones, F. Iriarte // Current pharmaceutical biotechnology. - 2009. - 11. - P. 48-57.
3. Phages in nature / M. R. Clokie, A. D. Millard, A. V. Letarov, S. Heaphy // Bacteriophage. - 2011. - № 1(1). - P. 31-45.
4. Occurrence and Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Vegetable Brassica Fields in Nepal / B. Jensen, J. Vicente, H. Manandhar, S. Roberts // Plant Disease. - 2010. - № 94. - P. 298-305.
5. Francisco-Francisco N. Fundamental aspects of Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Characteristic, Pathogenicity and Control / N. Francisco-Francisco, G. Morales, Y. Ochoa-Fuentes [et al.] // Revista Mexicana de Fitopatología. - 2013. - № 31. - P. 147-160.
6. ISTA. 7-019 Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods / S. J. Prepared by Roberts, H. Koenraadt. - Bassersdorf, Switzerland : International Seed Testing Association (ISTA), 2007. - URL: <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-019a-2014.pdf>
7. Jones, J. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. Jones, G. Vallad, F. Iriarte // Bacteriophage. - 2012. - № 2. - P. 208-214.
8. Vandamme, E. Phage therapy and phage control: To be revisited urgently / E. Vandamme // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. - 2014. - № 89. - P. 1-12.
9. Lu, T. K. The next generation of bacteriophage therapy / T. K. Lu, M. S. Koeris // Curr. Opin. Microbiol. - 2011. - № 14. - P. 524-531.
10. 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. - P. 98-105.
11. Civerolo, E. L. Relationships of *Xanthomonas pruni* Bacteriophages to Bacterial Spot Disease in *Prunus* / E. L. Civerolo // Phytopathology. - 1973. - Vol. 63(10). - P. 1279.
12. 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. - P. 401–413.

13. Fatmi, M. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material / M. Fatmi, R. R. Walcott, N. W. Schaad. - Second Edition. - 2016. - P. 360.

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

15. 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. Естественные и технические науки. - 2019. - № 6. - С. 20-25.

16. 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.

17. 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. - № 3(20). – P. 734-737.

TECHNOLOGY OF PRODUCTION AND CONTROL OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PHAGE BIOPRODUCT

Mayorov P.S., Feoktistova N.A., Mayorov O.S.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk region, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1

tel. : +7 (8422) 55-95-35

e-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

Keywords: bacteriophages, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, biological product, technological parameters, phytopathogen.

Traditional methods of combating bacterial diseases of plants, including vascular bacteriosis of Cruciferous plants, do not currently allow to achieve effective result, which, among other things, is associated with the ability of phytopathogens to adapt to changing environmental conditions. Application of bacteriophages as antibacterial agents is a farsighted and effective direction in the field of plant protection. The aim of the study was to develop a technology for production and control of *Xanthomonas campestris* phage biological product, taking into account previously defined technological parameters. The objects of the study were *X. campestris* pv. *campestris* CI34-UISAU bacteriophage isolated from cabbage samples with signs of vascular bacteriosis from the fields of Ulyanovsk region, Staromainsky district. As a production strain, we used *X. campestris* pv. *campestris* Xc2 bacterial strain. The authors carried out studies on selection of suitable conditions, taking into account previously defined parameters: a method for bacteriophage removal from a production culture of bacteria, suitable passage time for production of a phage preparation, appropriate balance of phage and bacterial culture for cultivation, suitable temperature for bacteriophage cultivation. The paper introduces a scheme for production and control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* phage biological product, which consists of 4 stages: sample preparation of a production culture of bacteria for compliance with the properties of the declared strain, sample preparation of a production strain of KI34-UISAU bacteriophage for compliance with its activity after storage, production of a phage product with reference to production scaling, pouring, purity control, bacteriophage titer, its specificity and spectrum of lytic action, storage of a biological product.

Bibliography:

1. 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.
2. Balogh, B. Phage Therapy for Plant Disease Control / B. Balogh, J. Jones, F. Iriarte // Current pharmaceutical biotechnology. - 2009. - 11. - P. 48-57.
3. Phages in nature / M. R. Clokie, A. D. Millard, A. V. Letarov, S. Heaphy // Bacteriophage. - 2011. - № 1 (1). - R. 31–45.
4. Occurrence and Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Vegetable Brassica Fields in Nepal / B. Jensen, J. Vicente, H. Manandhar, S. Roberts // Plant Disease. - 2010. - № 94. - P. 298-305.
5. Francisco-Francisco N. Fundamental aspects of Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* Smith): Characteristic, Pathogenicity and Control / N. Francisco-Francisco, G. Morales, Y. Ochoa-Fuentes [et al.] // Revista Mexicana de Fitopatología. - 2013. - № 31. - P. 147-160.
6. ISTA. 7-019 Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods / S. J. Prepared by Roberts, H. Koenraad. - Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), 2007. - URL: <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-019a-2014.pdf>
7. Jones, J. Considerations for using bacteriophages for plant disease control / J. Jones, G. Vallad, F. Iriarte // Bacteriophage. - 2012. - № 2. - P. 208-214.
8. Vandamme, E. Phage therapy and phage control: To be revisited urgently / E. Vandamme // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. - 2014. - № 89. - P. 1-12.
9. Lu, T. K. The next generation of bacteriophage therapy / T. K. Lu, M. S. Koeis // Curr. Opin. Microbiol. - 2011. - № 14. - P. 524-531.
10. 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. - P. 98-105.
11. Civerolo, E. L. Relationships of *Xanthomonas pruni* Bacteriophages to Bacterial Spot Disease in Prunus / E. L. Civerolo // Phytopathology. - 1973. - Vol. 63 (10). - P. 1279.
12. 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. - P. 401-413.
13. Fatmi, M. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material / M. Fatmi, R. R. Walcott, N. W. Schaad. - Second Edition. - 2016. - P. 360.
14. Mayorov, P.S. The main technological parameters of production of a biological product to combat the causative agent of vascular bacteriosis of cruciferous plants / P.S. Mayorov, N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. -2020. - № 1 (49). - P. 60-64.
15. Mayorov, P.S. Development of a scheme for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* bacteriophages / P. S. Mayorov, N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev // Modern science: current problems of theory and practice. Natural and technical sciences. - 2019. - № 6. - P. 20-25.
16. Algorithm for phage typing of *Bacillus cereus* bacteria / A. I. Kaldyrkaev, D. A. Vasilyev, N. A. Feoktistova, M. A. Lydina, T. G. Yudina, E. G. Klimentova // Agribusiness and ecology. - 2015. - № 2 (2). - P. 166-169.
17. 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. - № 3 (20). - P. 734-737.