

# РАЗРАБОТКА СХЕМЫ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* С ПРИМЕНЕНИЕМ БАКТЕРИОФАГА В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

**П.С. Майоров**

соискатель, Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина  
E-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

**Н.А. Феоктистова**

к.б.н., доцент, Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина  
E-mail: feokna@yandex.ru

**Д.А. Васильев**

д.б.н., профессор, Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина  
E-mail: dav\_ul@mail.ru

**Цель исследования** – разработка схемы реакции нарастания титра фага (РНФ) для индикации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

**Материал и методы.** Разработку схемы РНФ проводили с использованием бактериофага Кл34-УлГАУ и индикаторной культуры бактерий *X. campestris* pv. *campestris* Хс2 на основе методик, апробированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина.

**Результаты.** Представлена разработанная схема РНФ. Подобраны оптимальные параметры постановки РНФ: рабочее разведение фагового биопрепарата Кл34-УлГАУ составило  $10^4$  БОЕ/мл; разведение индикаторной культуры бактерий –  $10^7$  м.к./мл: время культивирования посевов с индикаторной культурой и фаговым биопрепаратом – 18 ч.

**Выводы.** Показано, что идентификация бактерий *X. campestris* pv. *campestris* на основе разработанной схемы реакции нарастания титра фага составляет 43 ч.

**Ключевые слова:** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, реакция нарастания титра фагов, ускоренная идентификация, биопрепарат.

**Для цитирования:** Майоров П.С., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* с применением бактериофага в лабораторных условиях. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(3): 13–17. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-03>

Бактерии *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* являются возбудителями сосудистого бактериоза у крестоцветных культур [1, 2]. Во всем мире данные бактерии являются одними из самых вредоносных возбудителей болезней овощных культур, включая Капустные. Бактерии рода *Xanthomonas* распространены по всему миру, особенно в районах с большим количеством осадков и средней температурой от 25 до 30 °С [3, 4].

В настоящее время применение бактериофагов для идентификации и борьбы с возбудителями бактериальных болезней растений является быстро расширяющимся направлением.

**Цель исследования** – подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага и создание схемы ускоренной идентификации бактерий *X. campestris* pv. *campestris* с применением разработанного биопрепарата в лабораторных условиях.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали бактериофаг Кл34-УлГАУ, активный в отношении бактерий *X. campestris* pv. *campestris*. Схема выделения и основные биологические свойства представлены в опубликованной ранее работе [5]. В качестве индикаторной культуры использовали штамм *X. campestris* pv. *campestris* Хс2.

**Питательные среды и реактивы:** агар бактериологический, пептон сухой ферментативный, триптон, экстракт дрожжевой, среда LB (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л), хлорид натрия, карбонат кальция, глюкоза.

**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.

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

Оптимальное время экспозиции выбирали из следующих параметров: при отсутствии предварительного подращивания и при предварительном подращивании исследуемого материала в течение 6, 15 и 24 ч, термостатирование посевов после добавления бактериофагов в течение 6, 12, 18, 24 ч при температуре  $28 \pm 1$  °С.

После проведения подготовки материала для исследований с учетом вышеописанных параметров выполняли работу по алгоритмам, отработанным на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ [6–9]. Оценку результатов исследований проводили на основе модифицированной оценки реакции нарастания титра фага (табл. 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 ч наблюдалась отрицательная или 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.

По результатам проведенных исследований установлено, что количественный показатель бактериофага Кл34-УлГАУ в опытной пробе 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 уже по истечению 18 ч (табл. 2).

**Таблица 1. 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

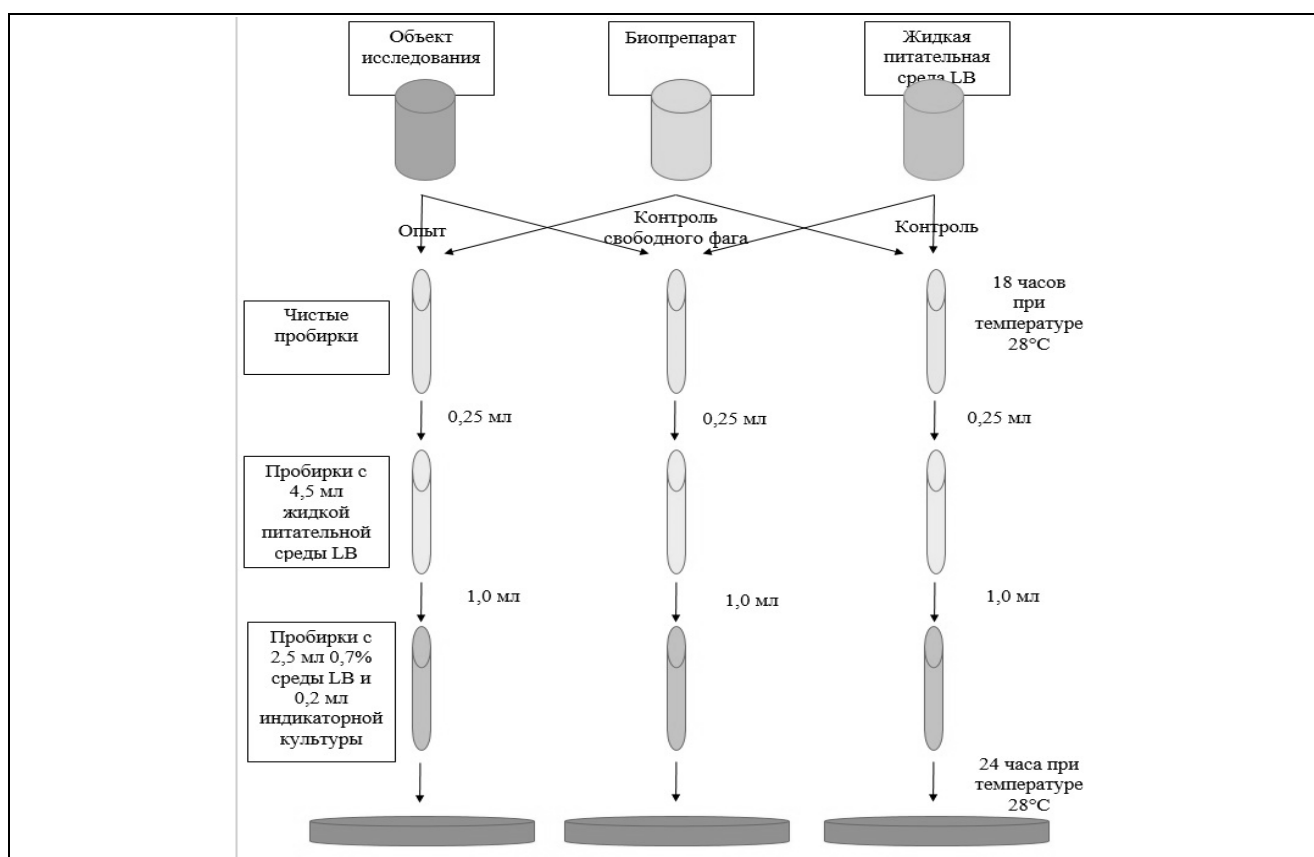
**Таблица 2. Результаты РНФ при культивировании в течение 18 ч без предварительного подращивания**

Концентрация объекта исследования (контаминированная бактериями <i>X. campestris pv. campestris</i> Хс2 среда LB), м.к./мл	Контроль индикаторного фага, 10 <sup>4</sup> БОЕ/мл	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение, раз
	Количество негативных колоний фага, БОЕ/мл			
10 <sup>7</sup>	14 ± 1	–	31 ± 1	2,21
10 <sup>8</sup>		–	36 ± 1	2,57

**Таблица 3. Чувствительность РНФ при различных параметрах культивирования (время культивирования посевов 18 ч)**

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

П р и м е ч а н и я : «+» – положительная чувствительность РНФ; «–» – отрицательная чувствительность РНФ; «л» – лизис.



Алгоритм постановки реакции нарастания титра фага с применением индикаторного бактериофага Кл34-УлГАУ

В соответствии с ранее установленными критериями оценки реакции нарастания титра фага, данные показатели можно считать диагностическими.

Полученные данные показали, что предварительное подращивание 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 подращивании культуры наблюдалось снижение чувствительности РНФ. Обобщенные результаты чувствительности РНФ при культивировании в течение 18 ч приведены в табл. 3. Обобщенная схема проведения реакции нарастания титра фага представлена на рисунке.

Исследуемые концентрации индикаторной культуры *X. campestris* pv. *campestris* Хс2 практически не оказывали существенного влияния на получаемый результат. В связи с этим принято решение в качестве рабочего разведения индикаторной культуры считать концентрацию *X. campestris* pv. *campestris* Хс2  $10^7$  м.к./мл.

Исходя из полученных, данных минимальный временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ составляет 43 ч (30 мин – закладка опыта; 18 ч – время культивирования посевов с индикаторной культурой и фаговым биопрепаратом; 30 мин – посев методом Грация; 24 ч – время культивирования на чашках Петри).

## ВЫВОДЫ

В рамках проведенных исследований по разработке схемы ускоренной идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* отработан алгоритм постановки реакции нарастания титра фага, по результатам которого в качестве рабочих параметров были приняты следующие: разведение фагового биопрепарата Кл34-УлГАУ –  $10^4$  БОЕ/мл, разведение индикаторной культуры бактерий  $10^7$  м.к./мл, предварительное подращивание исследуемого материала не применяется, время культивирования посевов с индикаторной культурой и фаговым биопрепаратом – 18 ч. Итоговое затрачиваемое время на постановку реакции нарастания титра фага составляет 43 ч.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mansfield J., Genin S., Magori S. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 2012; 13:614–629.
2. 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; 14:2–18.
3. Meenu G., Vikram A., Bharat N. Black rot – a devastating disease of crucifers: a review. Agriculture Reviews. 2013; 34:269–278.
4. Mishra S., Arora N.K. Evaluation of rhizospheric Pseudomonas and Bacillus as biocontrol tool for Xanthomonas campestris pv campestris. World J. Microb. Biot. 2012; 28:693–702.
5. Майоров П.С., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. Разработка схемы выделения бактериофагов Xanthomonas campestris pv. Campestris. Современная наука: актуальные проблемы теории и практики (серия Естественные и технические науки). 2019; 6:20–25.
6. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Феоктистова Н.А. Разработка схемы ускоренной индикации бактерий родов Pseudomonas и Bacillus, вызывающих порчу продуктов питания. Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. 2013; 171–173.
7. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Ульяновск. 2007. 39 с.
8. Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Фаго-идентификация бактерий Escherichia coli 0157. Инфекция и иммунитет. 2014; 5:98.
9. Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin C.N. Modification of method of Bacillus anthracis setting phage indication in samples of soil. Asian journal of microbiology, biotechnology and environmental sciences. 2018; 3(20):734–737.

Поступила после доработки 27 января 2020 г.

# DEVELOPMENT OF A SCHEME FOR ACCELERATED IDENTIFICATION OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS BACTERIA USING BACTERIOPHAGE IN LABORATORY CONDITIONS

© Authors, 2020

**P.S. Maiorov**

applicant, Ulyanovsk State Agricultural University (Ulyanovsk)

E-mail: pavelmayorovv@yandex.ru

**N.A. Feoktistova**

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Ulyanovsk State Agricultural University (Ulyanovsk)

E-mail: feokna@yandex.ru

**D.A. Vasilyev**

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Ulyanovsk State Agricultural University (Ulyanovsk)

E-mail: dav\_ul@mail.ru

**The aim** of the study was to develop a phage titer rise reaction (PRR) scheme for the indication of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* bacteria.

**Material and methods.** The PRR scheme was developed using the bacteriophage Cl34-Ulgau and the indicator culture of *X. campestris* pv. *campestris* bacteria Хс2 is based on the methods applied by the staff of the Department of Microbiology of the Ulyanovsk State Agricultural University.

Results. The paper presents the developed scheme of PRR. The optimum parameters for the formulation of the PRR. The working dilution of the phage biopreparation KI34–ULSAU was  $10^4$  BOE/ml. The dilution of the indicator culture of bacteria  $10^7$  mc/ml. the cultivation time of crops with indicator culture and phage biopreparation was 18 hours.

**Conclusion.** Identification of the bacteria *X. campestris* pv. *campestris* based on the developed phage titer rise reaction scheme is 43 hours.

**Key words:** bacteriophages, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, phage titer increase reaction, accelerated identification, biopreparation.

**For citation:** Maierov P.S., Feoktistova N.A., Vasilyev D.A. Development of a scheme for accelerated identification of *Xanthomonas campestris* bacteria using bacteriophage in laboratory conditions. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020; 23(3):13–17. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-03>

## REFERENCES

1. Mansfield J., Genin S., Magori S. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 2012; 13:614–629.
2. 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; 14:2–18.
3. Meenu G., Vikram A., Bharat N. Black rot – a devastating disease of crucifers: a review. Agriculture Reviews. 2013; 34:269–278.
4. Mishra S., Arora N.K. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. World J. Microb. Biot. 2012; 28:693–702.
5. Majorov P.S., Feoktistova N.A., Vasilyev D.A. Razrabotka skhemy vydeleniya bakteriofagov *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Sovremennaya nauka: aktual'nye problemy teorii i praktiki (seriya Estestvennye i tekhnicheskie nauki). 2019; 6:20–25.
6. Vasilyev D.A., Zolotuhin S.N., Feoktistova N.A. Razrabotka skhemy uskorennoj indikatsii bakterij rodov *Pseudomonas* i *Bacillus*, vyzyvayushchih porchu produktov pitaniya. Biotehnologiya: real'nost' i perspektivy v sel'skom hozyajstve. 2013; 171–173.
7. Zolotuhin S.N. Sozdanie i razrabotka skhem primeneniya diagnosticheskikh biopreparatov na osnove vydelennykh i izuchennykh bakteriofagov enterobakterij: Avtoref. diss. ... dokt. biol. nauk. Ul'yanovsk. 2007. 39 s.
8. Molofeeva N.I., Vasilyev D.A., Zolotuhin S.N. Fagoidentifikatsiya bakterij *Escherichia coli* O157. Infektsiya i immunitet. 2014; 5:98.
9. Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin C.N. Modification of method of *Bacillus anthracis* setting phage indication in samples of soil. Asian journal of microbiology, biotechnology and environmental sciences. 2018; 3(20):734–737.

## УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ !

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений  
приглашает принять участие в Международной научной конференции

**«От растения до лекарственного препарата»,**

которая состоится 4-5 июня 2020 года.

Тематика конференции:

1. Мобилизация генетических ресурсов лекарственных и ароматических растений для использования в медицине, фармацевтической и пищевой промышленности.
2. Лекарственное ботаническое ресурсосведение: биоразнообразие, популяционная биология, продуктивность лекарственных растений в природных экосистемах.
3. Лекарственное растениеводство: интродукция, селекция, агротехнологии.
4. Изучение метаболома растений.
5. Биотехнология в лекарственном растениеводстве.
6. Фитохимическое изучение и стандартизация лекарственного растительного сырья, субстанций и создание современных лекарственных форм.
7. Доклинические и клинические исследования лекарственных растительных средств.

Форма участия – очно-заочная Рабочие языки конференции – русский, английский.

Приём материалов (анкеты-заявки, тексты статей) – не позднее **03 апреля 2020 г.**

по e-mail: [conference@vilarnii.ru](mailto:conference@vilarnii.ru)

Информация о проведении представлена на сайте <http://vilarnii.ru/> в разделе «Конференции».