

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS

DEVELOPMENT OF THE SCHEME FOR THE ALLOCATION OF BACTERIOPHAGES XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS

**P. Maiorov
N. Feoktistova
D. Vasilev**

Summary. Studies on the release of bacteriophages *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by induction. As the inducing factors used ultraviolet rays with a wavelength of 254 nm and mitomycin C. The obtained results showed no transition prophage in free bacteriophage in bacteria *X. campestris* pv. *campestris* under the influence of inducing factors. Studies on the release of bacteriophages *X. campestris* pv. *campestris* of environmental objects. 8 bacteriophages were isolated from soil samples and cabbage samples with signs of bacteriosis. Based on the data developed a scheme for the isolation of bacteriophages of *X. campestris* pv. *campestris* of environmental objects, including 4 stages.

Keywords: bacteriophages; plant pathogens; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; profag; isolation; induction method.

Майоров Павел Сергеевич

Аспирант, Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина
pavelmayorovv@yandex.ru

Феоктистова Наталья Александровна

К.б.н, доцент, Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина
feokna@yandex.ru

Васильев Дмитрий Аркадьевич

Д.б.н, профессор, Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина
dav_ul@mail.ru

Аннотация. Проведены исследования по выделению бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* методом индукции. В качестве индуцирующих факторов использовались ультрафиолетовые лучи с длиной волны 254 нм и метомицин С. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии перехода профага в свободный бактериофаг у бактерий *X. campestris* pv. *campestris* под воздействием индуцирующих факторов. Проведены исследования по выделению бактериофагов *X. campestris* pv. *campestris* из объектов окружающей среды. Выделено 8 бактериофагов из образцов почвы и образцов капусты с признаками поражения бактериозом. На основе полученных данных разработана схема выделения бактериофагов *X. campestris* pv. *campestris* из объектов окружающей среды, включающая 4 этапа.

Ключевые слова: бактериофаги; фитопатогены; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; профаг; выделение; метод индукции.

Сосудистый бактериоз крестоцветных, вызываемый бактерией *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel, 1895; Dowson, 1939), является одним из наиболее опасных заболеваний сельскохозяйственных культур. Он поражает практически все известные растения, относящиеся к роду Капустные (Brassicaceae), большинство представителей которого являются возделываемыми культурами, имеющими важное продовольственное значение [1–4]. Заболевание может привести к значительным потерям, особенно в теплых и влажных условиях [5–6]. 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 [7–9].

В связи с этим видится возрастание роли бактериофагов с одной стороны, как эффективное средство идентификации бактерий-возбудителей болезней растений рода *Xanthomonas*, а с другой, как перспективное средство для борьбы с ними [10–11].

Первые полевые испытания по применению бактериофагов для борьбы с болезнями растений проведены Томасом в 1935 г., 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) [12]. Почти полвека спустя, в 1969, Civerolo и Keil применяли внекорневую обработку бактериофагами, за счет чего уменьшили тяжесть бактериального заболевания, вызванного бактериями *Xanthomonas pruni* на сеянцах персика на 86% — 100% [13].

В настоящее время применение бактериофагов для идентификации и борьбы с возбудителями бактериальных болезней растений является быстро расширяющимся направлением [14–16]. Бактериофаги в большей степени выгодны и могут быть использованы в качестве антибактериальных мер тогда, когда бактерии-возбудители широко представлены в природе [17–18].

Цель исследований — разработка схемы выделения бактериофагов, специфичных для бактерий *X. campestris pv. campestris*.

Материалы и методы исследований

В работе использовали 6 штаммов *X. campestris pv. campestris* — 3 штамма, выделенные из образцов пораженных растений в ходе проведенных ранее исследований, 3 штамма, полученные из коллекции кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

В качестве объектов окружающей среды для выделения бактериофагов использовали 16 образцов почвы, полученных с полей и фермерских хозяйств, занимающихся выращиванием сельскохозяйственных культур семейства Капустные и 28 образцов капусты с признаками поражения бактериозом.

Питательные среды и реактивы:

Мясопептонный агар (МПА) (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), мясопептонный бульон (МПБ) (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), агар бактериологический (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), пептон сухой ферментативный (HiMedia), триптон (HiMedia), экстракт дрожжевой (HiMedia), хлорид натрия (ООО «УлХим»), карбонат кальция (ООО «УлХим»), сульфат магния, гидрофосфат калия двузамещенный (ООО «УлХим»), глюкоза (HiMedia), трихлорметан.

Приборы и оборудование:

Лабораторная бактериологическая посуда, лупа бинокулярная МБС — 9, микроскоп «Биомед» с видеодатасистемой, водяная баня, термометр ртутный, лабораторные центрифуги ОПи-8УХЛ 4.2, ЦЛС — 3, СМ — 6 М с угловыми и баккет-роторами, дистиллятор, шкаф сушильно-стерилизованный ШСС — 80, автоклав ГК-100-3, холодильники минусовые и бытовые, термостат ТС-80М-2.

Работу по выделению бактериофагов проводили в соответствии с методиками, апробированными сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [19–20].

Результаты исследований и обсуждение

На первом этапе наших исследований проводилось выделение бактериофагов из культур бактерий путем воздействия на них индуцирующим фактором, в качестве которого применялись ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), источником которых служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90% излучаемой энергии в виде УФ-лучей с длиной волны 254 нм. В данном эксперименте использовали культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста. 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 под бактерицидной лампой БУВ на расстоянии 40 (50, 60) см, оставшуюся чашку выдерживали в зоне действия ультрафиолетовых лучей закрытой при тех же параметрах облучения.

Эксперимент проводился в затемненном помещении без доступа солнечных лучей с целью предохранения культур микроорганизмов, подвергшихся облучению, от фотореактивации.

Затем взвеси бактерий (3–4 мл) засеивали в отдельные пробирки с 5 мл питательной среды LB каждую и инкубировали в термостате при 28 °С в течении 24 часов. Параллельно осуществляли посев методом агаровых слоев и инкубировали при тех же условиях. 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 плотной питательной среде.

На втором этапе наших исследования проводилось выделение профага из бактериальных клеток воздействием на них химическим фактором, индуцирующим механизм репликации фаговой ДНК, в качестве которого использовался метомицин С в дозе 0,5 мкг/мл. Для этого в пробирки с питательным бульоном, содержащим 0,5 мкг/мл метомицина С, засеивали исследуемые культуры. Пробирки культивировали в течении 5–6 часов при 28 °С. После этого содержимое пробирок центрифугировали при 3000 об/мин в течении 20 минут и затем фильтровали через бактериальные 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



Рис. 1. Зоны лизиса на газоне культуры *X. campestris pv. campestris* Xcc 9 (МПА, 28 °С, 48 ч)

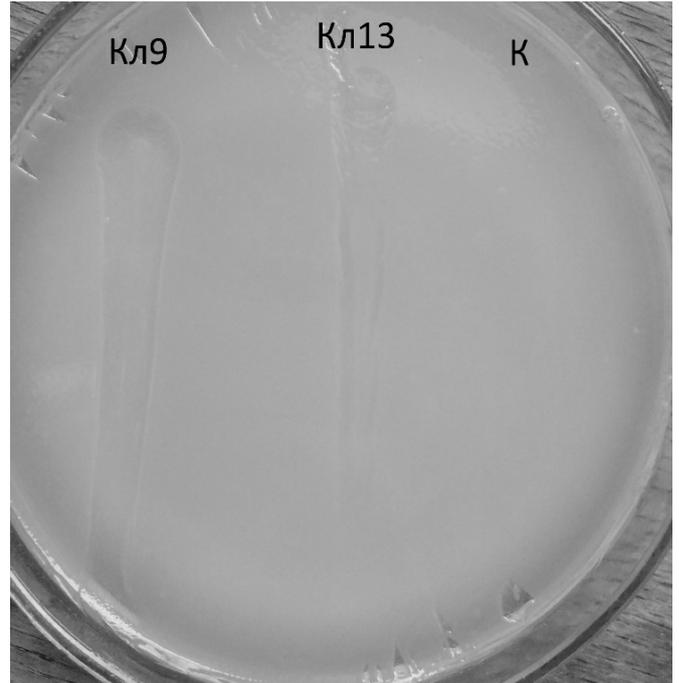


Рис. 2. Зоны лизиса на газоне культуры *X. campestris pv. campestris* Xcc 9 (YDC, 28 °С, 48 ч)

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.

По результатам проведенных исследований не обнаружено перехода профага в свободный фаг под воздействием индуцирующих факторов у имеющихся штаммов бактерий, в связи с чем на третьем этапе наших исследований проводилось выделение бактериофагов из объектов внешней среды по методикам Д. М. Гольдфарба в модификации И. П. Ревенко [20].

Для выделения бактериофагов из объектов окружающей среды 10 г исследуемого материала суспендировали в 50 мл МПБ. Затем в получившуюся суспензию добавляли по 2 мл 24-часовых культур бактерий *X. 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.

Полученную надосадочную жидкость очищали различными методами — прогреванием на водяной бане при 60 °С, добавлением в фильтрат хлороформа в кон-

центрации 1:10, фильтрованием через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм.

Полученные фильтраты исследовали на наличие в них бактериофагов методом «стекающая капля». Для этого на поверхность плотной питательной среды 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.

В эксперименте мы использовали различные плотные питательные среды (YDC, NBY, LB, МПА) с целью изучения влияния их состава на устойчивость бактерий *X. campestris pv. campestris* к действию бактериофагов.

О наличии в фильтрате бактериофагов судили по появлению зоны лизиса на газоне культуры (рис. 1).

По полученным данным лучше всего очистка бактериофагов от клеток бактерий проходили при добавлении в суспензию хлороформа в соотношении 1:10. Прогревание суспензии негативно сказывалось на литической активности бактериофагов. При этом существен-

Таблица 1. Источники выделения бактериофагов

Обозначение бактериофага	Источник выделения
Кл9	Листья капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область
Кл13	Листья капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область
Кл20	Листья капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область
Кл21	Листья капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область
Кл22	Листья капусты с признаками поражения бактериозом, Ульяновская область
32	Образец почвы, Ульяновская область
34	Образец почвы, Ульяновская область
37	Образец почвы, Ульяновская область

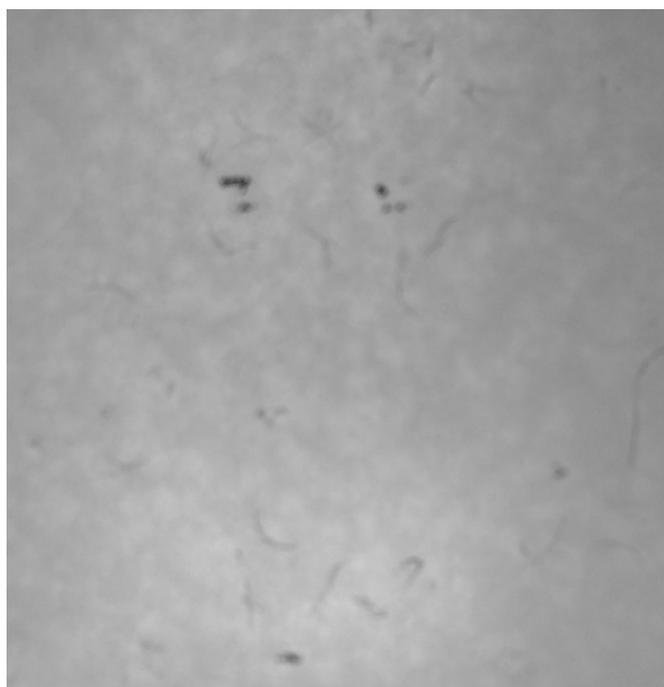


Рис. 3. Зоны лизиса методом агаровых слоев с культурой *X. campestris pv. campestris* Hcc 9 (МПА, 28 °С, 24 ч)

ное влияние на лизис бактериальных клеток оказывал состав питательной среды. Так на плотных питательных средах, содержащих источник углеводов, бактерии показали большую устойчивость к действию бактериофагов (рис. 2). Данный факт может обусловлен образованием бактериями *X. campestris pv. campestris* экзополисахаридов в присутствии источника углеводов, которые повышали устойчивость данных бактерий к внешнему воздействию.

Кроме того, проводился ряд экспериментов по выявлению бактериофагов в образцах пораженных растений и почвы без предварительного культивирования в присутствии бактерий *X. campestris* и очистки субстрата.



Рис. 4. Схема выделения бактериофагов *X. campestris pv. campestris*

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 полужидкого МПА (0,7%) добавляли 0,1 мл суточной культуры *X. campestris pv. campestris* 1 мл исследуемого субстрата. Затем получившуюся суспензию выливали на поверхность 1,5% МПА и культивировали при 28 °С в течении 24 часов. О наличии бактериофагов судили по появлению прозрачных зон лизиса на поверхности среды (рис. 3).

Полученные данные показали возможность применения данного метода для выявления бактериофагов

в образцах почвы и растений, однако наличие в образцах сопутствующей микрофлоры затрудняло обнаружение действия бактериофагов. В связи с этим принято решение дополнительно к данному методу применять метод очистки суспензии от бактериальных клеток с использованием хлороформа.

Всего по итогам проведенных исследований из 16 проб почвы и 28 проб растений выделено 8 бактериофагов. Результаты проведенных опытов представлены в таблице 1.

Поскольку выделить профаг методом индукции не удалось, наиболее рациональным считаем выделение бактериофагов бактерий *X. campestris pv. campestris* из объектов окружающей среды. Систематизируя полученные данные, разработана схема выделения бактериофагов *X. campestris pv. campestris*, которая представлена на рисунке 4. В качестве основных критериев при разработке данной схемы выступали:

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

На первом этапе проводится приготовлении суспензии из изучаемого образца почвы или растения и физ. раствора в соотношении 1:10, после чего данная суспензия оставляется на 20–30 минут для лучшей диффузии.

На втором этапе проводится грубая фильтрация суспензии с использованием ватных фильтров с целью ее очистки от крупных примесей. После чего полученный фильтрат центрифугируется при 3000 об/мин в течении 30 минут.

На третьем этапе проводится окончательная очистка суспензии от бактериальной массы с использованием хлороформа в соотношении 1:10. Обработка проводится в течении 20 мин с учетом времени на осаждении хлороформа на дно пробирки. Затем полученные очищенные фильтраты переносятся в стерильные пробирки.

На заключительном этапе производится определение бактериофагов в исследуемом фильтрате методом «агаровых слоев» для чего в 2,5 мл 0,7% МПА предварительно расплавленного и остуженного до 45°C добавляется 1 мл исследуемого фильтрата и 1–2 капли суточной культуры *X. campestris pv. campestris*. Полученная суспензия выливается на поверхность полноценного МПА. После этого чашки со средой культивируют при 28 °C в течении 24 +/- 1 часов. Наличие бактериофагов определяют по образованию зон лизиса на поверхности МПА.

Заключение

В рамках проведенных исследований изучена возможность выделения профагов из бактериальных клеток *X. campestris pv. campestris* методом воздействия на них физическими (УФ лучи) и химическими (метомицин С) факторами. Выделить бактериофаги бактерий *X. campestris pv. campestris* данными методами не удалось. Перехода профага в свободный фаг под воздействием индуцирующих факторов у исследованных штаммов бактерий не выявлено. Выделены 8 бактериофагов из объектов окружающей среды. На основе полученных результатов предложена оптимальная схема выделения бактериофагов из объектов окружающей среды для бактерий *X. campestris pv. campestris*, позволяющая определить наличие фагов в исследуемом образце в течении 24 +/- 1 часов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Щербakov A. A., Кузнецов M. A., Савина С. В., Скорляков В. М., Иващенко С. В., Муртаева В. С., Маниесон В. Э. Получение специфических антител к клеточным мембранам *Xanthomonas campestris* // Аграрный научный журнал. 2017. № 6, С. 46–49
2. Renu, Bhojar M. S., Singh U. B., Sahu U., Nagrale D. T., Sahu P. K. Characterization of lytic bacteriophage XCC9SH3 // Journal of Plant Pathology. 2017. № 99 (1). PP. 233–238. doi: 10.4454/jpp.v99i1.3817
3. Singh D., Rathaur P. S., Vicente J. G. Characterization, genetic diversity and distribution of *Xanthomonas campestris pv. campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India // Plant Pathology. 2016. № 65(9). PP. 1411–1418. doi: 10.1111/ppa.12508
4. 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 // Molecular Plant Pathology. 2012. № 14(1). PP. 2–18. doi: 10.1111/j.1364–3703.2012.00833.x
5. Williams P. H. Black rot: a continuing threat to world crucifers // Plant Disease. 1980. PP. 736–742. doi: 10.1094/PD-64–736.
6. Soudi M. R., Alimadadi N., Ghadam P. Minimal phenotypic test for simple differentiation of *Xanthomonas campestris* from other yellow-pigmented bacteria isolated from soil // Iran J Microbiol. 2011. № 3(2). PP. 84–91.
7. Gasic K., Ivanovic M. M., Ignjatov M., Calic A., Obradovic A. Isolation and characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages // Journal of Plant Pathology. 2011. № 93(2). PP. 415–423
8. Satish S. Raveesha K. A. Janardhana G. R. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars // Applied Microbiology. 1999. № 28(2). PP. 145–147. doi: 10.1046/j.1365–2672.1999.00479.x
9. Raghavendra B. T., Kirankumar A. C., Manjunatha C., Yadav D. K., Singh H., Srinivasa N. Collection, isolation and pathogenicity of *Xanthomonas campestris pv. campestris* causing black rot of crucifers // Environment & Ecology. 2013. № 31(1). PP. 187–189.

10. Майоров П. С., Феоктистова Н. А., Васильев Д. А. Подбор физических факторов инактивации бактерий *Xanthomonas campestris* // Материалы Международной научной конференции «Молодежь и наука XXI века». 2018. Том III. Ульяновск, УлГАУ, 2018. — С. 32–34
11. Balogh B., Jones J. B., Iriarte F. B., Momol M. T. Phage Therapy for Plant Disease Control // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2010. № 11(1). PP. 48–57. doi: 10.2174/138920110790725302
12. Thomas R. C. A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn // *Phytopathology*. 1935. № 25(3) PP. 71–72
13. Civerolo E. L., Keil H. L. Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage // *Phytopathology*. 1969. № 59(1) PP. 966–967
14. Васильев Д. А., Алёшкин А. В., Золотухин С. Н., Феоктистова Н. А., Куклина Н. Г., Майоров П. С., Сульдина Е. В., Мартынова К. В. Конструирование экспериментального биопрепарата на основе бактериофага ARS25-УГСХА для проведения биопроцессинга // *Естественные и технические науки*. 2018. № 2(116). С. 33–37.
15. Ahmad A. A., Ogawa M., Kawasaki T., Fujie M., Yamada T. Characterization of bacteriophages Cp1 and Cp2, the strain-typing agents for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* // *Appl Environ Microbiol*. 2014. № 80(1) PP. 77–85. doi: 10.1128/AEM.02310–13.
16. Buttner C., McAuliffe O., Ross R. P., Hill C., O'Mahony J., Coffey A. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases // *Frontiers in Microbiology*. 2017. № 8(34). doi: 10.3389/fmicb.2017.00034
17. Frampton R. A., Pitman A. R., Fineran P. C. Advances in Bacteriophage-Mediated Control of Plant Pathogens // *International Journal of Microbiology*. vol. 2012, Article ID326452, 11 p. doi: 10.1155/2012/326452
18. Jones J. B., Vallad G. E., Iriarte F. B., Obradovic A., Wernsing M. H., Jackson L. E., Balogh B., Hong J. C., Momol M. T. Considerations for using bacteriophages for plant disease control // *Bacteriophage*. 2012. № 2(4). PP. 208–214. doi: 10.4161/bact.23857
19. Feoktistova N. A., Vasilyev D. A., Zolotukhin S. N., Vasilyeva Y. B., Martynova K. V., Toigildina A. L., Toigildina I. A., Shvidenko I. G., Obuhov I. L. Modification of method of *Bacillus anthracis* setting phage indication in samples of soil // *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences Paper*. 2018. № 20(3). PP. 734–737.
20. Васильев, Д. А. Швиденко И. Г. Золотухин С. Н. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии. Ульяновск, 2016. 152 с.

© Майоров Павел Сергеевич (pavelmayorovv@yandex.ru), Феоктистова Наталья Александровна (feokna@yandex.ru),

Васильев Дмитрий Аркадьевич (dav_ul@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина