

УДК 579.8.06

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТОВ**М.А. Кузнецов¹, А.А. Щербаков¹, С.В. Иващенко¹, Е.А. Горельникова², Н.С. Червякова²**¹ СГАУ им. Н.И. Вавилова, Россия² РосНИИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора, Россия

Сосудистый бактериоз крестоцветных является одним из наиболее опасных заболеваний сельскохозяйственных культур. Он поражает практически все известные растения, относящиеся к семейству крестоцветных. В частности, это относится к роду капустные (*Brassicaceae*), большинство представителей которых являются возделываемыми культурами, имеющими важное продовольственное значение.

Возбудитель заболевания *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* согласно руководству по систематике бактерий Берджи 2005 года (том второй, протеобактерии, часть В, гаммапротеобактерии) [1] относится к классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Xanthomonadales*, семейству *Xanthomonadaceae*. Это грамотрицательная прямая палочка, подвижная за счёт одного полярного жгутика, аэробная, не восстанавливающая нитрат, оксидазоотрицательная, каталазоположительная, использующая в качестве источника углерода разнообразные углеводы и соли органических кислот, образующая маслянистые или клейкие гладкие жёлтого цвета колонии.

Возбудитель широко распространён в природе. Установлено [2], что патоген изолируется в радиусе 32 км от ближайшего источника инфекции, в связи с этим его диагностика, а также профилактика вызываемых им бактериозов является актуальной задачей.

Различные представители рода *Xanthomonas* отличаются по патогенности и обладают высокой специфичностью относительно поражаемых растительных объектов. Известно, что 27 видов этих бактерий имеют более 80 патоваров [3], но при этом отмечается, что даже при искусственном заражении патовар, характерный для одного вида растений, не вызывает поражения у других [4].

В связи с этим, актуальной становится задача точной идентификации возбудителя на уровне отдельных патоваров и их подробное описание и систематика. Применение современных комплексных методов лабораторной диагностики позволяют в короткие сроки и с достаточной достоверностью провести идентификацию микроорганизма с точностью до отдельных штаммов и патоваров [5] и, в соответствии с этими данными, определить целесообразность и соответствующие риски возделывания тех или иных сельскохозяйственных культур на данной территории, необходимость проведения карантинных мероприятий и выбрать наиболее эффективные способы предпосевной подготовки семян и грунта.

Из всех известных на сегодняшний день способов классификации микроорганизмов наиболее простым, доступным – и, вместе с тем, достаточно точным – является оценка их биохимической активности. В частности, достаточно широко распространено использование систем индикаторных бумажных (СИБ) и специальных комплексных диагностических тест-систем для биохимической идентификации микроорганизмов. Последние являются наиболее предпочтительными, так как позволяют при минимальных затратах получать достаточно полную информацию о конкретном виде, штамме исследуемого микроорганизма. За счёт использования идущих в комплекте цифровых баз данных коммерческие тест-системы позволяют упростить процесс идентификации уже известных и систематизации ещё не описанных штаммов.

В отношении бактерий рода *Xanthomonas* погрешность, присущая коммерческим тест-системам отчасти компенсируется тем, что при всём своём многообразии возбудитель сосудистого бактериоза обладает ярко выраженной видоспецифичностью. Кроме того, для решения задачи идентификации отдельных патоваров разрешающая способность этих систем является достаточной. Таким образом, использование подобных комплексных методик при изучении биоразнообразия бактерий рода *Xanthomonas* оправдано и целесообразно.

Цель работы – идентификация бактерий рода *Xanthomonas* с использованием сравнительного анализа биохимической активности возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных при помощи коммерческой тест-системы.

В ходе исследования решались задачи по выделению чистой культуры дикого возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных, установлению его соответствия с культурой музейного штамма и сравнению его биохимических признаков с культурами широко распространённых в естественной среде микроорганизмов.

Для проведения работы были взяты культура микроорганизмов вида *X.campestris* В-610, полученного из коллекции Института биохимии, физиологии растений и микроорганизмов РАН, а также диких штаммов семейства *X. campestris* pv. *campestris*, полученных из тканей заражённых растений взятых с приусадебных участков г. Саратова и Вольского района Саратовской области.

Для постановки сравнительного анализа использовались штаммы *Escherichia coli* М-616, *E. coli* 1027, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *abony* М-767, *Yersinia pseudotuberculosis* III и *Y. enterocolitica* ser. 0:3 66–82, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, штамм *Proteus* sp., полученный из музея кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»).

Выделение дикого штамма проводилось суточным посевом на плотную среду Эйкмана, содержащую 1 % пептона, 1 % сахарозы, 0,5 % NaCl и 0,5 % дрожжевого гидролизата. Посев проводился по методу Дригальского с последующим отбором колоний. Выделенные культуры хранились в музее кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» на скошенной среде Эйкмана при температуре +4...+5 °С.

Непосредственно при проведении работы использовались суточные культуры перечисленных выше штаммов. Для этого проводился их высеив на скошенный соево-казеиновый агар и культивирование при температурах их оптимального роста.

Анализ проводился с использованием тест-системы API 10S, в трёхкратной повторности. Процедура анализа выполнялась в соответствии с изложенной в инструкции стандартной методикой. Результаты анализа учитывались визуально, непосредственно или после добавления соответствующих реактивов. Запись результатов проводилась на входящих в комплект тест-системы стандартизированных бланках. Для интерпретации результатов каждому из исследуемых штаммов по результатам реакции присваивался соответствующий числовой профиль, который затем соотносился с базой данных системы.

Полученные в ходе исследования результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Числовые профили штаммов, использованных в работе

Вид штамма	Наименование штамма	Числовой профиль	Совпадение профилей
<i>E. coli</i>	М-616	7305	<i>E. coli</i> 1
<i>E. coli</i>	1027	7345	–
<i>V. enterocolitica</i> ser. 0:3	66–82	0210	–
<i>V. pseudotuberculosis</i>	III	7420	–
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>abony</i>	М-767	7755	–
<i>Proteus</i> sp	–	6775	–
<i>X. campestris</i>	В-610	7010	–
<i>X. campestris</i>	pv. <i>campestris</i> 1	7004	<i>Echerichia vulneris</i> , <i>Pantoea</i> sp, <i>Echerichia coli</i> 2
<i>X. campestris</i>	pv. <i>campestris</i> 2	7044	–
<i>X. campestris</i>	pv. <i>campestris</i> 3	7000	–
<i>X. campestris</i>	pv. <i>campestris</i> 4	7000	–

Биохимические признаки штаммов *Xantomonas*, дикого и музейного, являются типичными для их видовой принадлежности. При этом у музейного штамма наблюдалось наличие признаков продукции сероводорода, тогда как у образцов дикого штамма они отсутствовали. Помимо этого, дикие штаммы имеют способность к восстановлению нитратов. Также, у выделенных диких штаммов семейства *X. campestris* pv. *campestris*, наблюдались приводящие к неоднозначности интерпретации колебания активности триптофандеаминазы и ферментов, участвующих в утилизации цитратов. (таблица 2).

Таблица 2. Отличие биохимических свойств штаммов *X. campestris* pv. *campestris*, выделенных из растительных объектов от музейного штамма *X. campestris* B-610

Штамм	Источник получения	Числовой профиль	Отличия от музейного штамма
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1	Саратовская обл., Вольский р-н	7004	Восстановление нитратов, отсутствие продукции H ₂ S
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 2	Саратовская обл., г. Энгельс	7044	Триптофандеминаза, восстановление нитратов, отсутствие продукции H ₂ S
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 3, 4	Саратовская обл., г. Саратов, Кировский р-н	7000	Отсутствие продукции H ₂ S

Наиболее выраженные отличия в биохимической активности наблюдались в сравнении с *Y. enterocolitica*, *Proteus* sp и *S. enterica*. Наиболее близкими по биохимическим свойствам показали себя *E. coli* M-616 и *E. coli* 1027.

Характерным является совпадение разных профилей образцов дикого штамма возбудителя с бактериями видов *Echerichia vulneris*, *Pantoea* sp, *Echerichia coli* и микроорганизмами рода *Yersinia*. Однако, источник получения образцов ксантомонад не является характерным для перечисленных видов микроорганизмов, что не даёт оснований говорить о контаминации образцов посторонней микрофлорой и, как следствие, о нарушении чистоты эксперимента.

В ходе исследования были определены числовые идентификационные профили микроорганизмов вида *X. campestris* и установлены их различия в биохимической активности по сравнению с другими, широко распространёнными в природе, видами микроорганизмами.

Выявлены характерные внутривидовые различия между музейным и выделенными штаммами *X. campestris* – касающиеся, в частности, активности триптофанаминазы и продукции H₂ S и NO₂ – что, возможно, является следствием приспособления возбудителя к конкретным условиям среды обитания. Данный факт объясняет совпадение профилей отдельно взятых образцов выделенных штаммов с бактериями видов *E. vulneris*, *Pantoea* sp, *E. coli* и микроорганизмами рода *Yersinia*. Тем не менее, несмотря на показатели биохимической активности, схожие у выделенных штаммов с микроорганизмами других родов и видов, их отличие по целому ряду параметров достаточно существенно. Это позволяет говорить о возможности применения тест-системы API 10S для идентификации сосудистого бактериоза крестоцветных – при условии использования её в комплексе с другими методами идентификации.

Недостатком идентификации *X. campestris* с использованием тест-системы API10S является визуальный способ учёта результатов анализа, способный приводить к неоднозначной их интерпретации и, как следствие, ошибкам в работе. Целесообразным является использование фото- и колориметрических способов с применением соответствующего аппаратного оснащения, что помогло бы повысить точность метода и, возможно, усовершенствовать его, дав возможность количественного определения биохимической активности микроорганизмов.

Таким образом, по итогам выполненной работы можно сделать следующие выводы:

1. Установлены числовые профили диких и музейного штаммов возбудителя сосудистого бактериоза *X. campestris* с использованием тест-системы API-10S.
2. Дикие штаммы *X. campestris* pv. *campestris* отличаются от музейного штамма *X. campestris* B 610 по способности к восстановлению нитратов и отсутствию продукции сероводорода.
3. Тест-система API-10S может быть использована для диагностики, идентификации и описания биохимических характеристик микроорганизмов вида *X. campestris* на уровне отдельных патоваров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Second Edition. – Volume TWO: The Proteobacteria. – Part B: The Gammaproteobacteria. Editor-in-chief George M. Garrity – Springer-Verlag New York, 2005. – 1106 p.
2. Е.С. Мазурин, Ф.С. Джалилов, А.Н. Игнатов, Ю.А. Варицев – Усовершенствование диагностики заражённости семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза методом иммуноферментного анализа. // Известия ТСХА, 1, 2009 год
3. В.С. Зотов. Биоразнообразие бактерий рода *Rhizobium* и *Xanthomonas* и создание молекулярной системы их идентификации и диагностики. Диссертация на соискание учёной степени к-та биологических наук. Москва, 2013 г.
4. В.В. Козулин. Углеводсодержащие биополимеры *Xanthomonas campestris* и их роль в фитопатогенных процессах. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук. Саратов, 2009 г.
5. Н.С. Червякова. Оптимизация подходов к установлению аутентичности и консервации лабораторных штаммов патогенных микроорганизмов. Диссертация на соискание учёной степени к-та биологических наук. Саратов, 2017 г.