

# ФАГОТЕРАПІЯ БАКТЕРІОЗІВ

## Виділення і характеристика бактеріофагів *Pseudomonas syringae* pt. *tomato*, як потенційних агентів біоконтролю фітопатогена

Перевірено зразки томатів із симптомами бактеріального ураження на наявність бактеріофагів, специфічних до *Pseudomonas syringae* pt. *tomato*. Зразки відібрані протягом літнього вегетаційного періоду в агроценозах Київської області. Віруси, специфічні до цільового мікроорганізму, були виділені, накопичені та досліджені за допомогою вірусологічних методів, встановлено їх морфологію та проведено лабораторні дослідження перспективності використання одержаних ізолятів у фаготерапії бактеріозів, спричинених *Pseudomonas syringae* pt. *tomato*.

### бактеріофаги, фаготерапія, *Pseudomonas syringae* pt. *tomato*

*Pseudomonas syringae* — небезпечний і широко розповсюджений збудник хвороб солодкого перцю (*Capsicum annuum* L.), томатів (*Solanum lycopersicum* L.), пшениці (*Triticum sp.* L.) та багатьох інших економічно важливих сільськогосподарських культур. Мікроорганізм-аероб має полярну флагелу та здатний до утворення коротких латеральних джгутиків, що полегшують та сприяють інвазії рослини, належить до родини *Pseudomonadaceae*, групи Грампозитивних мікроорганізмів. Поширений убіквітарно, наразі виділяють понад 50 патоварів *Pseudomonas syringae*, серед яких найбільшої шкоди рослинництву завдають *Pseudomonas syringae* pt. *tomato* та *Pseudomonas syringae* pt. *syringae*. Передається через насіння, у ґрунті мікроорганізми поширюються за допомогою водяної фази між часточками гумусу та іншими компонентами ґрунту. За вирощування рослин в умовах закритого ґрунту основними джерелами *Pseudomonas syringae* pt. *tomato* є контаміноване насіння, пророщені молоді рослини, що, як правило, не мають симптомів на ранніх стадіях вегетації і не завжди підлягають дотриманню карантину, іригаційні води та контакт рослин із носіями мікроорганізму (знаряддями праці, контамінованими приладами). Симптоми, що з'являються у резуль-

**С.А. ЗАЙКА,**  
аспірант

**А.В. ХАРІНА,**  
кандидат біологічних наук

**М.О. ШАПОВАЛ,**  
магістр

**І.Г. БУДЗАНІВСЬКА,**  
доктор біологічних наук

**В.П. ПОЛІЩУК,**  
доктор біологічних наук, професор  
Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка

таті ураження рослини фітопатогенним мікроорганізмом, проявляються у вигляді «чорної ніжки» стебла, почорніння та загнивання зелених плодів і плодів, що дозрівають. На пізніх стадіях за системної реакції у хворих рослин відбувається порушення росту: міжвузля видовжуються, коренева система деградує; на верхівкових листках спостерігається розвиток хлорозів, що за короткий проміжок часу перероджуються у некрози. Згодом спостерігається дефоліація. Мікроорганізм витримує промерзання, висушування та здатний необмежено довго існувати на рослинних рештках [1].

Неефективні методи знезараження посадкового матеріалу, зокрема насіння, унеможливлені використання антибіотиків задля профілактики бактеріозів та норми контролю вмісту біологічно активних речовин у продуктах рослинництва призвели до поширення *Pseudomonas syringae* pt. *tomato* у господарствах та зростання економічних втрат, пов'язаних зі шкідливістю цього мікроорганізму [2].

**Застосування фагових препаратів.** Розглядається можливість розробки альтернативних засобів проти фітопатогенних мікроорганізмів на основі бактеріофагів — високоспецифічної і гетерогенної групи вірусів бактерій. Бактеріофаги були відкриті Фредеріком Туортом та Феліксом Д'Ерелем у 20-ті роки ХХ

століття. З моменту свого відкриття Д'Ерель почав застосовувати виділені ним агенти для профілактики та лікування хвороб людей, а 1924 року з'явилася перша робота Моллана і Хейстрита, в якій була показана ефективність лізатів у попередженні гниття капусти, викликаному фітопатогенними мікроорганізмами виду *Xanthomonas campestris* pt. *campestris* [3]. Таким чином, вже на початку ХХ століття виникли передумови зародження нового напрямку у лікуванні рослин від бактеріальних інфекцій за допомогою вірусів — аграрної фаготерапії.

Наразі ефективні протимікробні препарати на основі вірусів розробляють і використовують у кількох країнах світу. Прикладом успішного застосування фагового препарату є Агріфаг компанії OmnyLytics, Солт-Лейк-Сіті, США. Препарат представляє собою високоочишену суміш фаголізатів *Xanthomonas campestris* pt. *vesicatoria* та *Pseudomonas syringae* pt. *tomato* і рекомендований як обов'язковий для профілактики хвороб на полях більшості штатів США [4].

Українські вчені мають схожі нароби, проте більшість фітопатогенів, проти яких створено ці препарати, втратили свою актуальність і були витіснені новими мікроорганізмами, що потрапляють в агроценози України з інших країн.

**Мета досліджень** — виділення та характеристика бактеріофагів, специфічних до *Pseudomonas syringae* pt. *tomato*, оцінка перспектив подальшої розробки біопрепаратів на їх основі.

**Матеріали і методи.** Фітопатогенний мікроорганізм *Pseudomonas syringae* pt. *tomato* одержали з музею культур ІМБІГ НАН України. Для роботи з мікроорганізмами у рідкому середовищі використовували середовище Лурія-Бертони (бактотриптон — 1%, дріжджовий екстракт — 0,5%, NaCl — 1%, H<sub>2</sub>O — 1 л). Для висіву мікроорганізмів на агар та перевірки активності фагів за методом Грація використовували стандартний

агар Міллера (пептон — 1%, дріжджовий екстракт — 0,5%, NaCl — 1%, агар-агар — 1,4/0,7% відповідно, H<sub>2</sub>O — 1 л) у концентраціях 1,4% — нижній, 0,7% — верхній. Для роботи з вірусами використовували нічну культуру *Pseudomonas syringae pt. tomato* на скошеному агарі Міллера [5].

Вірусомісний матеріал — томати з симптомами, характерними для *Pseudomonas syringae pt. tomato* — гомогенізували в ступках і заливали стерильним фізіологічним розчином (10 г NaCl на 1 л H<sub>2</sub>O). Одержану масу центрифугували у режимі 5000 об./хв протягом 25 хв [6]. Отримані надосади відбирали у стерильні пробірки і додавали по 3 мл хлороформу.

На наступному етапі зразки висівали на бактеріальний газон методом подвійних агарових шарів [7]. У верхній агар вносили по 300 мкл досліджуваного фітопатогенного мікроорганізму і 1 мл зразка.

Якщо утворювалися негативні колонії, поодинокі колонії сколювали і переносили у стерильні мікропробірки з фізіологічним розчином (1 мл). Після інкубації за температури 4°C протягом 12 год фаг титрували до 10<sup>-6</sup> БУО/мл і висівали у чашки Петрі методом Грація. Чисті лінії фагів виділяли після щонайменше п'ятиразового пасування вірусу з окремої поодинокі колонії [7].

Для накопичення вірусів використовували метод аерації [7]. У стерильні тригорлі колби наливали 150 мл стерильного рідкого середовища LB, додавали 15–20 мл змиву нічної культури *Pseudomonas syringae pt. tomato* та 1–3 поодинокі колонії, сколені з агару після одержання чистої лінії. Далі колбу ставили на аерацію протягом 12 год за температури 24–26°C. Позитивним вважали результат, за якого середовище всередині колби залишалося прозорим після 12 год аерації. Далі титр вірусу після накопичення визначали за допомогою спот-тесту [7].

Після накопичення одержані фаголізати піддавали диференційному центрифугуванню (5000 об./хв 20 хв, 37000 об./хв (~100000 g) 120 хв), отримані осади ресуспендували стерильним фізіологічним розчином (200 мкл).

Морфологію виділених вірусів досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (модель JEM-1400, лабораторія біофізичних досліджень при Інституті мікробіології та вірусології

ім. В.К. Заболотного НАН України). Для одержання сіточок-підкладок використовували 0,1% розчин формвару у хлороформі. Препарат контрастували 2% розчином уранілацетату [8].

**Результати.** У результаті роботи віруси, специфічні до *Pseudomonas syringae pt. tomato*, виявили у зразках плодів томатів (n=20) із вираженими симптомами бактеріального ураження (почорніння плодів, хлоротичні та некротичні плями на листових пластинках, загнивання стебел), відібраних в агроценозах Київської області. Після первинного висіву зразків на газоні спостерігали утворення негативних колоній різного розміру та морфології, титр вірусів у нативному зразку був високим (10<sup>5</sup> БУО/мл) (рис. 1).

За подальшого титрування на газоні спостерігалося утворення негативних колоній 9-ти типів, що були відокремлені і описані як самостійні ізоляти (Ψф 1–9). У подальшому увагу акцентували на ізолятах, які давали великі негативні колонії — Ψф 1 (діаметр 8–10 мм, без ореолів, нечіткий край), Ψф 2 (діаметр 9 мм, утворюють ореол) та

Ψф 3 (діаметр 7 мм, чіткий край, без ореолів), оскільки вони проявляли високу вірулентність до запропонованого живителя, що важливо для використання вірусів у якості профілактичних та лікувальних агентів у майбутньому.

Після накопичення у рідкому поживному середовищі було встановлено титри вірусів (Ψф 1 — 2×10<sup>10</sup> БУО/мл, Ψф 2 — 4×10<sup>9</sup> БУО/мл, Ψф 3 — 4×10<sup>8</sup> БУО/мл). Далі віруси концентрували шляхом ультрацентрифугування та досліджували за допомогою електронного мікроскопа. Було встановлено, що ізолят Ψф 1 є представником родини Podoviridae, капсид змішаного типу симетрії: ікосаедрична голівка діаметром ~50 нм сполучена з коротким не скоротливим хвостовим відростком завдовжки ~7–10 нм (рис. 2). Фаг належить до морфотипу С1.

Електронно-мікроскопічні дослідження ізоляту Ψф 2 показали присутність серед віріонів, властивих родині Podoviridae, нетипових сферичних вірусних часток, що, можливо, є дефектними вірусними часточками або вірусом-сателітом (рис. 3)

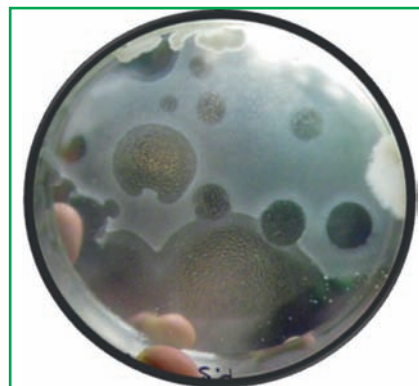


Рис. 1. Нативний висів зразка, одержаного із плодів ураженого томата

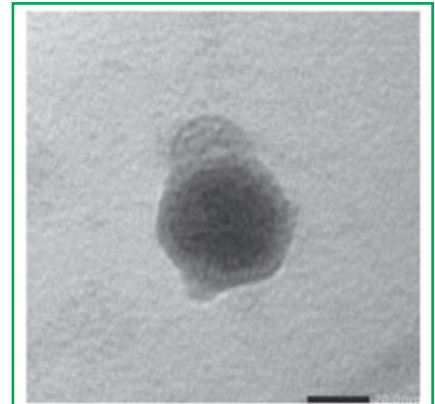


Рис. 2. Електронно-мікроскопічне зображення бактеріофагу ізоляту Ψф 1, бар 20 нм

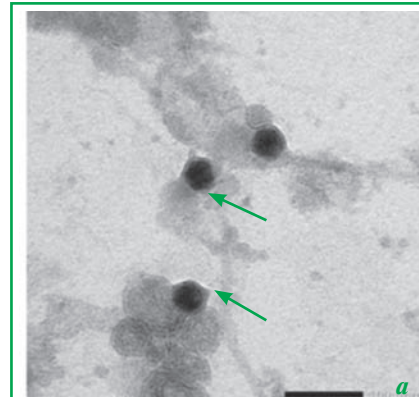
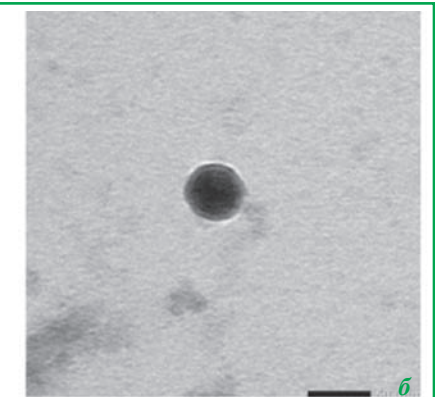


Рис. 3. Електронно-мікроскопічне зображення віріонів ізоляту Ψф 2: а — нормальні фагові часточки із хвостовими відростками (вказано стрілками, бар 100 нм); б — дефектна вірусна частка (бар 50 нм)



Імовірно, присутність цих часток зумовлює утворення ореолів та нерівних країв негативної колонії, що нагадують негативні колонії. Явище фагових вірусів-сателітів вивчено погано; можливо, округлі частини — це дефектні частинки фагу *Ψφ 2*, або віріони, що змінили морфологію під дією таких факторів, як диференційне центрифугування та обробка ураніацетатом. Віруси, які мають хвостові відростки, належать до родини *Podoviridae*, морфотипу *C1*.

Дані, одержані за допомогою електронного мікроскопа для ізоляту *Ψφ 3*, вказують про можливу належність вірусу до родини *Podoviridae*. Морфологія капсиду та його розміри збігаються з даними для подовірусів, проте на отриманих електронно-мікроскопічних зображеннях ми не спостерігали структур, що нагадували хвостовий відросток (рис. 4).

У результаті перевірки виділених ізолятів на досліджуваному мікроорганізмі було показано їх здатність повністю лізувати газон *Pseudomonas syringae pt. tomato* у концентрації  $10^5$  БУО/мл *in vitro*, що відповідає концентраціям, рекомендованим для застосування згідно з літературними та практичними даними [9]. В умовах експерименту ми не спостерігали вторинного росту резистентної мікрофлори на чашках Петрі з повністю лізованими бактеріальними газонами навіть після 96 год інкубації за температурного оптимуму для *Pseudomonas syringae pt. tomato*. Всі ізоляти належать до родини *Podoviridae* — бактеріофагів з високим рівнем стійкості до дії факторів навколишнього середовища та детергентів, а незначні розміри (до 60 нм) дають змогу припустити, що віруси зможуть легко транспортуватися судинною системою вищих рос-



лин (діаметр каналів 2—500 мкм) [10] без пошкодження цілісності капсиду й уражувати клітини мікроорганізму-живителя у будь-якій частині зараженої ним рослини.

### ВИСНОВКИ

У результаті роботи перевірені зразки овочів із симптомами ураження, характерними для *Pseudomonas syringae pt. tomato*. Бактеріофаги, специфічні до цільового фітопатогенного мікроорганізму, виділені, накопичені та досліджені за допомогою методу електронної мікроскопії. Після одержання чистих ліній встановлено концентрацію вірусу, що повністю пригнічує ріст бактеріальної культури, при цьому вторинний ріст резистентної мікрофлори не спостерігали. Виділені ізоляти належать до родини *Podoviridae*, морфотипу *C1*, розмір вірусів не перевищував 60 нм. Порівняно невеликі розміри, стійкість до детергентів та висока вірулентність дають можливість розглядати виділені фаги як потенційні агенти проти *Pseudomonas syringae pt. tomato* на полі та в закритому ґрунті.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens / K. Rudolph, T.J. Burr, J.W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian and J. von Kietzell. // *Developments in plant pathology*. — 1997. — Vol. 9. — P. 574—583.
2. Hirano S.S. Population Biology and Epidemiology of *Pseudomonas syringae* / Hirano S.S., Upper C.D. // *Phytopathology*. — 1990. — Vol. 28. — P. 155—177.
3. Mallmann W.L. Isolation of an inhibitory substance from plants / Mallmann W.L., Hemstreet C.J. // *Agric. Res.* — 1924. — P. 599—602.
4. *Bacteriophages for Plant Disease Control* / J.B. Jones, L.E. Jackson, B. Balogh, A. Obradovic, F.B. Iriarte and M.T. Momol // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 2007. — Vol. 45. — P. 245—262.
5. Атабеков И.Г. Практикум по общей вирусологии. — М.: Издательство Московского университета. — 1981. — 192 с.
6. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. — М.: Наука, 1981. — 288 с.

7. Carlson K, Kutter E., Sulakvelidze A. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Appendix: Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches. — Boca Raton: CRC Press, 2005. — P. 437—494.

8. Миронов А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: Методологическое руководство / Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. — СПб.: Наука, 1994. — 400 с.

9. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato / Balogh B., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Obradovic A. // *Plant Dis.* — 2003. — Vol. 87. — P. 949—954.

10. Sperry J.S. Evolution of water transport and xylem structure // *International Journal of Plant Sciences*. — 2003. — Vol. 164, № 3. — P. 115—127.

Заика С.А., Харина А.В., Шаповал М.О., Будзановская И.Г., Полищук В.П.

**Выделение и характеристика бактериофагов *Pseudomonas syringae pt. tomato* как потенциальных агентов биоконтроля фитопатогена**

Образцы томатов, отобранные в агроценозах Киевской области, проверены на присутствие вирусом, специфических к *Pseudomonas syringae pt. tomato* — возбудителю бактериальной пятнистости томатов. Бактериофаги, специфические к целевому микроорганизму, обнаружены в образцах томатов с симптомами развития бактериальной инфекции. Вирусы были разделены на изоляты, накоплены и изучены с помощью метода электронной микроскопии. Бактериофаги в концентрациях, рекомендуемых к использованию для профилактики и лечения бактериозов растений, полностью лизировали газон *Pseudomonas syringae pt. tomato*.

**бактериофаги, фаготерапия, *Pseudomonas syringae pt. tomato***

Заика С.А., Харина А.В., Шаповал М.О., Будзановская И.Г., Полищук В.П.

**Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae pt. tomato* and their potential as biological control agents**

The samples of rotten tomatoes, collected on agricultural lands of the Kiev region were tested for the presence of viruses specific to *Pseudomonas syringae pt. tomato* — the causative agent of bacterial spot of tomato. Bacteriophages specific for the target microorganism were found in the samples of tomatoes. Viruses were divided into isolates, accumulated and examined using electron microscopy. Bacteriophages caused lysis of bacteria *Pseudomonas syringae pt. tomato* in concentrations recommended for use in the prevention and treatment of plant bacteriosis.

**bacteriophages, phage therapy, *Pseudomonas syringae pt. tomato***

Рецензент:

Буцацький Л.П., доктор біологічних наук, професор кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

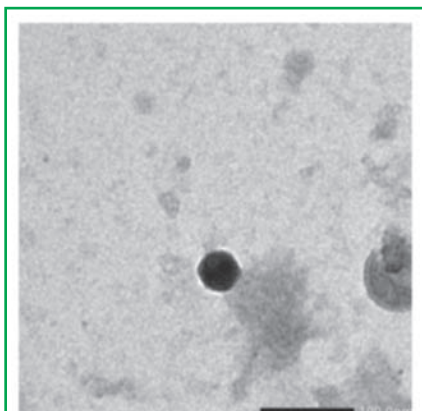


Рис. 4. Електронно-мікроскопічне зображення віріонів ізоляту *Ψφ 3*, бар 100 нм