

03.00.00 Biological Sciences

03.00.00 Биологические науки

UDC 57

Extraction and Study of Bacteriophages, Used against Agents of Potato Soft Rot¹Magda D. Davitashvili²Lela Z. Tsiklauri¹⁻²Iakob Gogebashvili Telavi State University, Georgia

Kartuli University Street 1, Telavi, 2200

Dr. (Biology), Associate professor

E-mail: magdadav@gmail.com

²Dr. (Technical), Assistant professor

E-mail: l_wiklauri@yahoo.com

Abstract. The use of specific bacteriophages and their complex mixtures against bacterial diseases is very effective. As for causative agent of potato soft rot *Erwinia carotovora*, specific phages (25 phages in total) were extracted from diseased potato, soil and sewage. The study of their biological properties showed the diversity of phages in terms of lytic action, virion plaque and morphology, as well as in relation to different environmental factors. Phages showed explicit antibacterial activity in vitro in liquid and solid media, as well as during model tests of potato tubers artificial inoculation.

Keywords: phytopathogenic bacteria; potato bacteriophages; bacteriophage; lytic spectrum; infected tubers.

Введение. Фитопатогенные бактерии рода *Erwinia* наносят большой вред картофелю – стратегической сельскохозяйственной культуре. Вызванные ими экономические потери достигают от 20 % до 80 %. В арсенале мероприятий по борьбе против бактериозов картофеля биологические средства занимают мало места. Используемые ныне различного типа агротехнические, физические и химические средства требуют значительных затрат трудовых ресурсов, часто вызывают загрязнение среды и создают угрозу здоровью человека. Поэтому на сегодняшний день в развитых странах большое значение придаётся биологическим методам борьбы с вредителями, методам, опирающимся на использование бактерий-антагонистов, энтомопатогенных бактерий, а также бактерий и вирусов, специфических ферментов, фитонцидов, феромонов и других биологически активных веществ [1, 2]. Весьма перспективно также использование специфических бактериофагов и их комплексных смесей в борьбе с бактерицидными заболеваниями растений.

Для защиты культуры картофеля от фитопатогенных бактерий крайне важны поиск и использование безопасных средств для человека и среды. В этом смысле, заслуживает внимания использование естественных защитных биологических препаратов, созданных путём подбора специфических фагов против патогенных бактерий, что даёт возможность получить беспестицидный, экологически чистый продукт.

Цель данного исследования – поиск специфических бактериофагов против бактерий рода *Erwinia*, их выделение и характеристика.

Материалы и методы. Для выделения фагов в качестве материала мы использовали различные органы заражённого картофеля, образцы почвы, а также сточные воды. Эксперименты по выделению бактериофагов проводились посезонно. Было установлено, что в зимние месяцы и ранней весной специфические фаги против патогенов картофеля в окружающей среде фактически не были выявлены, что в первую очередь, было связано с минимальной численностью бактерий, с которыми фаги сталкиваются в окружающей среде, а также с климатическими факторами. Наряду с повышением температуры и влажности возрастала частота выделения фагов, которая достигала пика к концу лета – началу осени. Другими авторами была отмечена также сходная динамика количественного содержания фагов [3, 4].

Мы производили выделение фагов методом очищения от сточных вод и заражённых растений различных географических зон. Растительный материал мы обрабатывали в фосфатном буфере и затем в центрифуге в течение 30 минут 5000 об/мин. Испитание полученного супернатанта на содержимость проводилось с использованием ориентационного спот-теста, а затем методом двухслойного агара [3, 5]. Чистые линии фагов получаем в результате 5–10 последовательных пассажей, а установку их точного титра на данный бактериальный штамм мы производили методом двухслойного агара [3, 5]. Морфологию вириона бактериофагов мы изучали при помощи IEM-1200CX и электронного микроскопа Option-Zeiss 10M. Препараты мы готовили методом негативного контрастирования с использованием 2%-ного раствора уранил-ацетата. Изучение фаз взаимодействия клетки-хозяина протекало путём определения скорости и интенсивности адсорбции на чувствительную клетку, длительности латентного периода и величины среднего выхода. Чувствительность фагов на физико-химические (температура, pH, ультрафиолетовое излучение, концентрация ионов в растворе и др.) мы изучали стандартными методами [3, 4, 5]. Размножение и концентрацию бактериофагов мы производили в жидкой среде на балтушке при 25–30°C в колбах или на стойкую среду методом двухслойного агара. Дальнейшее очищение препаратов бактериофагов мы производили путём дифференциального центрифугирования (20000 об/мин 1-1,5 ч). Эффективность действия бактериофагов мы изучали *in vitro* в твёрдой и жидкой среде и в модельных опытах на картофельных дисках, где была создана аналогичная хранилищу среда (высокая влажность и температура 18-25°C). Инфицирование клубней фитопатогенными бактериями мы производили с использованием стандартного метода установления патогенности [6]. Клубни мы обрабатывали, используя фаговые суспензии с рабочим титром (10^8 - 10^9 частиц/мл). Расчёт результатов мы производили через 24-96 часов; устанавливалось количество здоровых и имеющих симптомы гнили картофельных клубней/дисков. Степень развития заражения оценивалась по бальной системе.

Результаты и их обсуждение. В результате проведённых исследований было выделено 62 фаговых изолятов. Выделенные фаги составили гетерогенную популяцию в зависимости от места выделения. После нескольких циклов клонирования /концентрирования фаги были сгруппированы в зависимости от основных биологических свойств (лизисный спектр, негативная колония и морфология вириона и др.). В результате анализа данных лизисного спектра бактериофагов наметились следующие группы: 1. Фаги с узким лизисным спектром; 2. Со средним лизисным спектром (составляют 5–20 % лизисов штаммов, подлежащих исследованию) и 3. фаги с широким спектром, которые производят 20–40 % лизисов штаммов фитопатогенного картофеля. Выяснилось, что по классификации Аккермана большинство выявленных бактериофагов относится к классу хвостатых фагов [7], однако выявилось максимальное многообразие в виде представителей семьи сифовиридов, миовиридов и подовиридов.

Таблица.

**Показатели цикла взаимодействия с клеткой хозяином
бактериофагов *Erwinia carotovora***

Фаги	Бактериальный штамм	Время максимальной адсорбции (мин)	Процент адсорбции	Латентный период (мин)	Лизисное время (мин)	Выход фага (част./кл.)
Pp1	<i>E. carotovora</i> K114	12	85	20	20	88
Pp2	<i>E. carotovora</i> K114	15	87	25	15	95

Для оценки функционирования структурных компонентов бактериофагов большое значение имеет изучение инактивирующего воздействия на них целым рядом физических и химических факторов [3, 8]. Изучение температурной зависимости отобранных бактериофагов показало, что бактериофаги рода *Erwinia*, подлежащие исследованию почти полностью сохраняют жизнеспособность при нагревании до 50°C в условиях стандартной 10-минутной экспозиции. Более высокое температурное воздействие уже вызывает сокращение

жизнеспособности фагов. Нагревание фагов в течение 10 минут при температуре 65°C вызывает снижение их жизнеспособности в 4 и более раз. Более чувствительным оказался фаг Pp2, который потерял инфекционность на 90 % при нагревании до 65°C в течение 10 минут.

В результате проведённых исследований против распространенных в Грузии бактериальных патогенов с целью создания рабочей коллекции было подобрано 25 бактериофагов. Из них изучение двух фагов (Pp1-Pp2) осуществилось более детально. При их электронно-микроскопном изучении было установлено, что они характеризуются сходным морфологическим строением и в то же время разными размерами. В препаратах фагов Pp1 и Pp2 были выявлены вирионы с характерной удлинённой гексагональной головой и сжимающимся хвостом средней длины, в зависимости от этого эти фаги относятся к семье миовиридов, в частности, к группе фагов Т-парного типа.

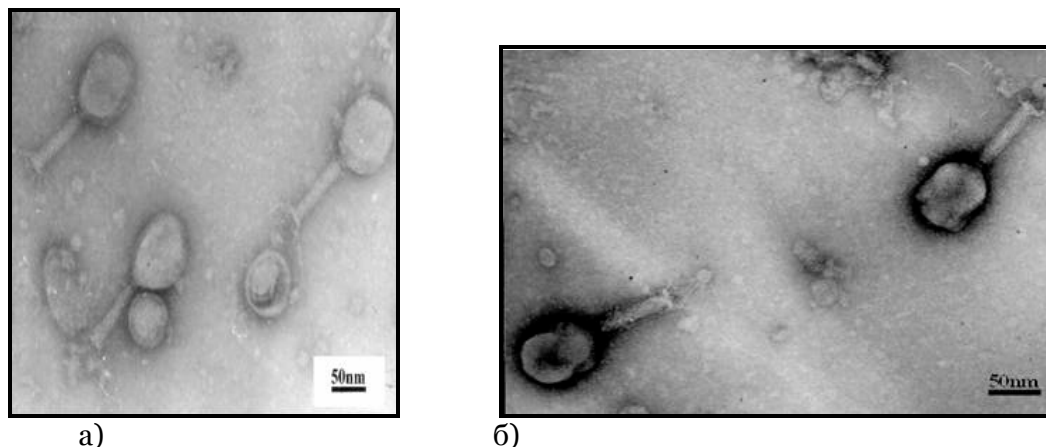


Рис. Морфология вириона специфических бактериофагов *Erwinia carotovora*
а) Pp1; б) Pp2

Оказалось, что так же, как и другие вирусы растительных патогенов, объекты нашего исследования тоже сохраняли стабильность в пределах достаточно широкого диапазона рН (5,0-10,0). Увеличение рН до щелочного уровня (>10) в исследуемых фагах вызывало постепенную инактивацию. Следует отметить, что в итоге даже в условиях рН 12,0 всё же происходило выявление жизнеспособных частиц бактериофагов Pp1 и Pp2, хотя титр сокращался на 4–5 рядов. Изучение других физиологических свойств, таких как чувствительность по отношению к цитрату натрия и к осмотическому шоку, также выявило различия между исследуемыми фагами. В результате инкубации в растворе NaCl 4М и последующего 100-разового разбавления в дистиллированной воде отмечалось резкое сокращение количества частиц инфекционного фага, в случае фагов Pp1 и Pp2. Кроме того, фаги Pp1 и Pp2 подвергались осмотическому шоку.

Антибактериальная терапевтическая эффективность бактериофагов по отношению к соответствующим фитопатогенам (в основном *Erwinia* sp.) была изучена во время лабораторных модельных опытов на клубнях картофеля и дисках, изготовленных из клубней, где была использована бальная система учёта количества здоровых и заражённых клубней/дисков: 0 баллов – заболевание не отмечено (авирулентный штамм); 1 балл – диаметр заражённой ткани достигает 10 мм (слабовирулентный); 2 балла – диаметр заражённой ткани приблизительно равен 20 мм (средневирулентный); 3 балла – диаметр заражённой ткани превышает 20 мм (сильновирулентный).

Смоделированные эксперименты с использованием высокотитрованных препаратов бактериофагов были разбиты на два основных блока: 1. Одноразовое действие фагов при одновременном введении бактериальных патогенов и фагов; 2. Трёхразовое введение фаговой суспензии с интервалами в 24 часа. В контрольных группах наряду со стандартным заражением клубней картофеля происходила их обработка растворами медного купороса, гидрохлорида тетрациклина, а также физиологическим раствором.

Исследуемые фаги выявили заметную антибактериальную активность *in vitro* (как в жидкой, так и в твёрдой среде), а также в экспериментах искусственного заражения клубней

картофеля. Вместе с тем, следует отметить, что используемые в опытах сульфат меди и тетрациклин незначительно превышали антибактериальную активность фагов, однако если мы примем во внимание экологическую безопасность бактериальных фагов, преимущество будет очевидным.

В будущем бактериофаги займут важное место в системе интегрированной защиты культуры картофеля от вредных организмов.

Примечания:

1. Борьба с болезнями растений: устойчивость и восприимчивость. Пер. с англ. под ред. Р. Стейнлза, Г. Тенисена. М.: «Колос», 1984. С. 272.

2. Schnabel E.L., Jones A.L. Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. Appl. Environ. Microbiol., 2001, v.67, No 1. p.59-64.

3. Габрилович М.И. Основы Бактериофагии. Минск. «Высшая школа», 1973. С. 150.

4. Чанишвили Т.Г. Дизентерийно-диагностические бактериофаги. Дисс. докт. наук, 1969.

5. Адамс М. Бактериофаги. Москва, Изд. «Иностранная Литература», 1961. 527 с.

6. Тедиашвили М., Давиташвили М., Лашхи Н., Хухунашвили Т., Коберидзе Т., Гиорхелидзе Д., Церцвадзе Г., Чанишвили Т. Изучение биологических свойств некоторых специфических бактериофагов против фитопатогенных бактерий // Известия Академии Наук Грузии, сер. биол., 2001, т. 27, № 1-3. С. 45-51.

7. Ackermann H.W. Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol. Sci., 1987, V.4, No.7, p. 214-218.

8. Chanishvili N., Chanishvili T., Tediashvili M. and Barrow P.A. Phages and their application against drug-resistant bacteria. Review. J. Chem., Technol. Biotechnol, 2001, 76, p. 689-699.

УДК 57

Выделение и изучение специфических бактериофагов против возбудителей мягкой гнили картофеля

¹ Магда Давидовна Давиташвили

² Лела Зурабовна Циклаури

¹ Телавский государственный университет, Грузия

2200, г. Телави, ул. Картули Университети, 1

Доктор биологических наук, ассоциированный профессор

E-mail: magdadav@gmail.com

² Телавский государственный университет, Грузия

2200 Телави, ул. Картули Университети, 1

Доктор технических наук, ассистент профессор

E-mail: l_wiklauri@yahoo.com

Аннотация. Очень перспективно использовать специфические бактериофаги и их комплексные смеси в борьбе с бактериальными заболеваниями. В отношении возбудителей картофельной мягкой гнили *Erwinia carotovora* были выделены специфические фаги (всего 25 фагов) из органов зараженного картофеля, почвы и сточных вод. Изучение их биологических свойств выявило значительное многообразие фагов по спектру литического действия, негативной колонии и морфологии вириона, а также по отношению к различным факторам внешней среды. Фаги выявили явную антибактериальную активность *in vitro* в жидкой и твердой среде, а также в модельных экспериментах искусственного заражения картофельных клубней.

Ключевые слова: фитопатогенные бактерии; бактериозы картофеля; бактериофаг; лизисный спектр; заражение клубней.