

Burton D.R., Scott J.K. Identification and characterization of a peptide that specifically binds the human, broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody b12 // J. Virol. – 2001. – V. 75(14). - P. 6692-9.

УДК 578.81

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ФАГОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ КАРТОФЕЛЯ

Андрійчук Е.Н., кандидат биологических наук
Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка, Украина
+380675045549, aom502@ukr.net

Ключевые слова: Бактериофаги, фитопатогенные бактерии, литическая активность, БОЕ.

Работа посвящена исследованиям фагов фитопатогенных бактерий *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Raenibacillus polytuxa* 9034 с целью изучения их влияния на патогенную микрофлору. Изучено морфологию негативных колоний, определен спектр литической активности фагов до 20 штаммов бактерий. За особенностями строения фаги были отнесены к таксономическим группам.

Введение. При выращивании и хранении сельскохозяйственных продуктов специалисты постоянно сталкиваются с проблемой поражения растений бактериальными заболеваниями. В связи с длительным использованием химических средств для защиты растений в Украине, чрезвычайно важной является задача разработки новых, экологически чистых средств защиты растений. Традиционные методы химической защиты растений не позволяют избирательно воздействовать на отдельные микроорганизмы, не уничтожая нормальную микрофлору агроценозов. Бактериофаги (вирусы бактерий) не имеют этого существенного недостатка. Проявляя специфичность и поражая только определенные группы бактерий, фаги предотвращают как распространение инфекционных заболеваний у растений, так и истощение черноземов. Внедрение новой экологически обоснованной системы ведения сельского хозяйства и защиты растений является важной научной задачей, что позволит получить полноценную конкурентоспособную продукцию сельскохозяйственного производства без остатков ядохимикатов. Их основным преимуществом является безопасность для человека и окружающей среды, а также более дешевое производство.

Целью работы было - получить и охарактеризовать изоляты фагов к бактериям - патогенов *Solanum tuberosum* и проведение их сравнительного анализа для дальнейшей разработки высокоэффективного и экологически безопасного антибактериального препарата на основе вирусов микроорганизмов для борьбы с бактериальными болезнями растений.

Материалы и методы исследований. Объектом исследований были изоляты фагов, выделены к *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325- туберкулез сахарной свеклы; *Pseudomonas fluorescens* 8573- мягкая гниль; *Raenibacillus polytuxa* 9034 - гниль картофеля. В работе использовали индикаторные культуры фитопатогенных бактерий, полученных из коллекции музея Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, отдела фитопатогенных бактерий (штаммы: *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325; *Pseudomonas fluorescens*

8573; *Paenibacillus polymyxa* 9034; *Clavibacter michiganensis* sump. *sepedonicus* 7750; *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) 8982; *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* 8446); *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 223; *Erwinia carotovora* 216; *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 1025; *Pseudomonas syringae* pv. *ap-tata* 185; *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 8646; *Pseudomonas chlororophis* 8612; *Burkholderia gladioli* pv. *allicola* 8494; *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 4228; *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013; *Pseudomonas viridiflava* 8867; *Pseudomonas syringae* pv. *ap-tata* 8545; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8653; *Clavibacter michiganensis* sump. *sepedonicus* 7750; *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 8446.

Чистые линии бактериофагов получали путем шестикратного пассирования с использованием методом выкалывания отдельных негативных колоний. Были получены изоляты бактериофагов, которые использовали в дальнейшем для работы.

Для выращивания бактерий и титрования фагов использовали готовые коммерческие агаризованные питательные среды, на основе рыбного гидролизата. Разведение фагов проводили на 0,9% растворе NaCl (физиологический раствор) или коммерческом мясном бульоне, приготовленном согласно инструкции предприятия-изготовителя. Титр определяли по Грациа и методом spot-test в бляшкообразующих единицах на мл (БОЕ / мл).

Концентрирования и очистку фагов проводили методами высокоскоростного центрифугирования в градиенте плотности CsCl. Дальнейшая очистка вируса (от остатков цезия CsCl) проводилась методом дифференциального центрифугирования.

Контроль чистоты выделенных вирусных препаратов определяли спектрофотометрическим, электронномикроскопическим методами. Электронномикроскопический анализ образцов проводили по общепринятым методикам.

Морфологию вирусных частиц изучали с помощью электронного микроскопа Jeol JEM - 1400. Препараты готовили методом негативного контрастирования уранилацетатом. Анализ электроннограмм показал, что исследуемые фаги отличались по строению вирионов и размеру.

Результаты исследований и их обсуждение.

Выделение бактериофагов проводили с проб корнеплодов картофеля, которые отбирали из отдельных овощехранилищ разных регионов Украины. Бактериофаги выделяли до фитопатогенных бактерий семейств *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Xanthomonas*. Выбор индикаторных культур был обусловлен высоким удельным весом фитопатогенных бактерий этих семейств среди возбудителей, вызывающих болезни картофеля.

Образцы отбирали из клубней картофеля за характерными симптомами бактериального заболевания. В основном бактериальные болезни проявляются во время хранения. И именно поэтому образцы отбирали после хранения их в овощехранилищах. При поражении картофель размягчается и увлажняется, превращаясь в слизистую массу темно-бурой или розовой окраски с неприятным запахом. В хранилище заболевание чаще наблюдается в верхнем слое (20 - 25 см), где сохраняется повышенная влажность воздуха. Болезнь обостряется при резких колебаниях температуры, повышенной влажности воздуха, переохлаждении или подмораживании клубней, механическими повреждениями, а также при заражении их другими болезнями - бурой бактериальной гнилью, черной ножкой, мягкой гнилью, кольцевой гнилью. Для предотвращения заболевания необходимо своевременно и бережно убирать продукцию, тщательно отбирать здоровый посадочный материал и поддерживать оптимальный режим хранения.

В отдельных агроценозах было обнаружено колебание эффективности выделения фагов по числу положительных проб в зависимости от региона. О распределении положительных результатов по регионам Украины, то можно акцентировать, что бактериофаги к *Paenibacillus*

polymyxa 9034 и *Pseudomonas fluorescens* 8573 встречались чаще других. К бактерии *X. axonopodis pv. beticola* 7325 было обнаружено лишь один положительный результат.

Кроме этого, еще было замечено сильное колебание биологической активности выделения бактериофагов из природных биоценозов. Было очень тяжело выделить из почвы изоляты фагов. Этот факт свидетельствует о низкой вероятности распространения и сохранения популяции бактериофагов именно в почве. Это может объясняться коротким сроком хранения бактерий в почве и применением севооборотов на опытных полях [1].

Для получения чистых линий проводили не менее шести пассажей.

Сравнительная характеристика титров бактериофагов проводили с помощью тест-культур (*X. axonopodis pv. beticola* 7325; *Pseudomonas fluorescens* 8573; *Paenibacillus polymyxa* 9034, проведенных по разным методикам: титрование по Грация и титрования методом spot-test.

Для дальнейшей работы были отобраны образцы с определенными симптомами гнили - кольцевая гниль картофеля, мягкая гниль.

Изучены и исследованы негативные колонии бактериофагов, которые были получены в лаборатории, различались по размерам, особенностями морфологии и скорости формирования их негативных колоний.

Для первого цикла исследований отбирали фаги 8573, 8573/гр, 8573/5 - чувствительная культура *Pseudomonas fluorescens* 8573, они образовывали прозрачные бляшки диаметром от 1 до 3 мм; фаги 7325\1 - чувствительная культура *X. axonopodis pv. beticola* 7325 образовывали прозрачные бляшки диаметром от 0,1 до 0,5 мм (рис. 1). Фаги 9034/1, 9034/4, 9034/5, 9034/8 - чувствительная культура *Paenibacillus polymyxa* 9034 - образовывали прозрачные бляшки диаметром от 1 до 7 мм (рис. 2).

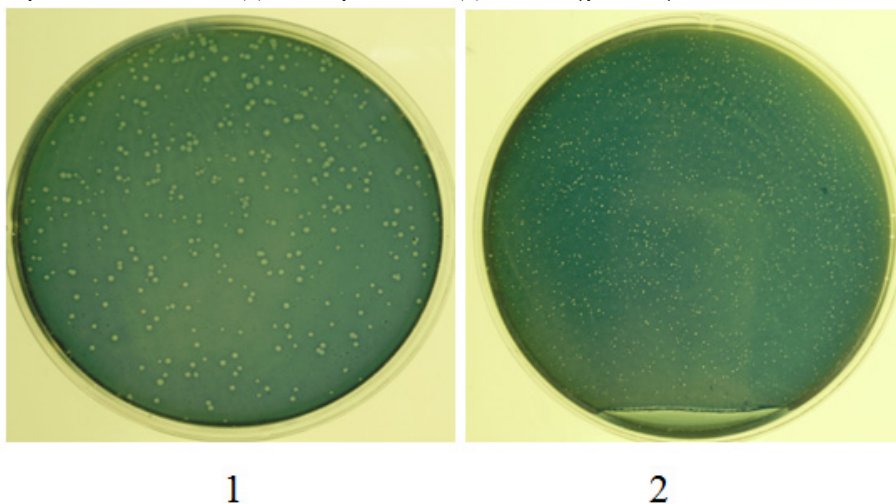


Рис. 1. - Морфология негативных колоний группы фагов: 1 – 7325 чувствительная культура - *X. axonopodis pv. beticola* 7325; 2 - 8573 чувствительная культура - *Pseudomonas fluorescens* 8573

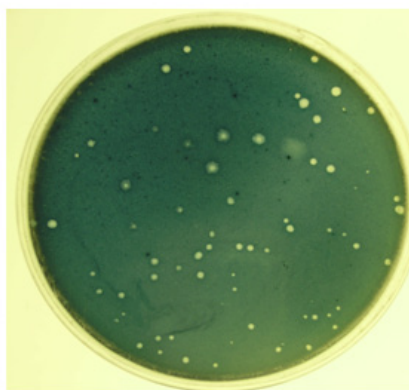


Рис. 2 - Морфология негативных колоний группы фагов 9034 - чувствительная культура - *Paenibacillus polymyxa* 9034

Сравнение морфологии негативных колоний исследуемых фагов показывает их различие. Более детальное изучение их свойств является важным для анализа распространения фагов в агроценозах, изучение их спектра литической активности.

При изучении репродукции вирусов бактерий в экосистемах важным свойством является спектр их литической активности, определение которого позволяет учитывать возможные пути переноса генетической информации в природе.

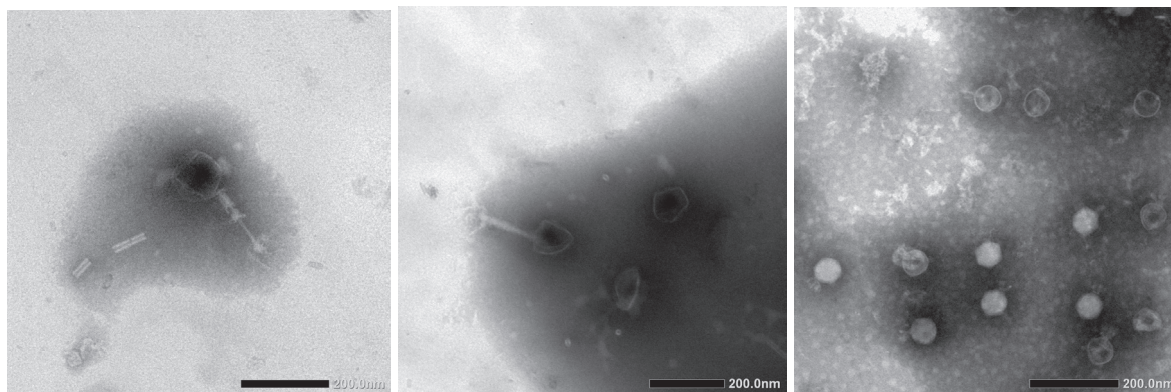
По спектру литической активности фаги были проверены на 20 штаммах бактерий, которые относились к четырем семействам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas* и *Erwinia*.

В пределах определенного штамма бактерий по спектру литической активности бактериофаги 9034\2, 9034\3, 9034\4, 8573\1, 7325\1 были узкоспецифические и не лизировали другие штаммы фитопатогенных бактерий, кроме тех, к которым они были и выделены, то есть они являются моновалентными.

Широкий спектр литической активности имели фаги 9034\1, 8573\2, 8573\3. Они лизировали фитопатогенные бактерии родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, относящихся к разным видам. Изоляты фагов оказались поливалентными.

Среди исследуемых изолятов фагов три проявляли литическую активность по отношению к культурам, которые являются довольно широко распространенным в природе патогенами картофеля, возможно в процессе эволюции вирусы приспособились к репродукции на различных чувствительных культурах.

Среди изолятов выявлено группу фагов, с икосаэдрической головкой и длинным хвостовым отростком, который несокращается, и относятся к семейству *Siphoviridae*, порядка *Caudovirales*, с размерами: диаметр головки - 67 ± 2 нм, длина хвостового отростка - 120 ± 3 нм.



а)

б)

в)

Рис. 3 - Электронномикроскопическое изображение фагов: а) 7325 №1; б) 9034; в)

8573

Другая группа фагов с икосаэдрической головкой и маленьким отростком, которые относятся к семейству *Podoviridae*, порядка *Caudovirales* и имели размеры: диаметр головки - 43 ± 1 нм, длина хвостового отростка - 1 нм [2]. Фотографии представлены на рис. 3.

Закключение.

Исследования, посвященные предупреждению развития бактериозов еще требуют дальнейшего развития, однако показана перспективность проведения биологического контроля численности бактерий с помощью фагов на практике.

Библиографический список

1. Семчук Л.И. Токарчук Л.В. Распространение и специфичность бактериофагов фитопатогенных бактерий в природных биоценозах // Микробиологический журнал. –1994. –№56. –с.102.
2. Ackermann H.-W., Calendar and S.T. Abedon (eds.). Classification of bacteriophages. *The Bacteriophages*, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press. - 2006. – p. 8–16.

CHARACTERIZATION ISOLATED PHAGES OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM POTATO

Andriychuk E.N.

Key words: bacteriophages, phytopathogenic bacteria, lytic activity, PFU.

Phages of phytopatogenic X. axonopodis pv. beticola 7325, Pseudomonas fluorescens 8573, Paenibacillus polymyxa 9034 were studied to evaluate their influence on pathogenic bacteria. Study morphology of negative colonies. The range of their lytic activity to 20 bacterial strains was determined. During special morphological characteristics phages were referred to taxonomic groups.