

УДК 578.81

АНДРІЙЧУК О.М., РОМАШЕВ С.А., СЕМЧУК Л.І, ЯЦКОВСЬКА Л.І., ІГНАТЕНКО Т.О.,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна

Андрійчук Олена Миколаївна – к.б.н.б, м.н.сп. Київського національного університету імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра вірусології

Семчук Лідія Іванівна – к.б.н., с.н.сп. Київського національного університету імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра

Ромашев Сергій Альбінович – провідний інженер Київського національного університету імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра вірусології

Яцковська Лариса Іванівна – провідний інженер Київського національного університету імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра вірусології

Ігнатенко Тетяна Олексіївна – провідний інженер Київського національного університету імені Тараса Шевченка, біологічний факультет, кафедра вірусології

ФАГИ ЯК ЧИННИКИ ВПЛИВУ НА ЧИСЕЛЬНІСТЬ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ В

Фаги, як один із біологічних чинників, впливають на чисельний і видовий склад бактерій та є важливими компонентами біоценозів. Коеволюція фагів і бактерій забезпечує певну рівновагу їх поширення та збереження. Проводиться обговорення результатів досліджень, що моделюють процеси збереження популяції фагів фітопатогенних бактерій при їх штучному внесенні в лабораторних умовах та в агроценозах.

Phages as one of biological factors, influence numerical and specific structure of bacteria and are the important components biocenoses. Coevolution of phages and bacteria provides the certain balance at their preservation and distribution. Discussion results of researches, which model processes of preservation of phytopatyogenic bacteria phage' populations at their artificial entering in laboratory conditions and in agrocenoses is carried out.

Актуальною проблемою сільського господарства є боротьба та профілактика бактеріальних захворювань технічних культур. Вони не лише призводять до значних втрат врожаю, але й значно погіршують якість продукції та спричиняють великі втрати при її подальшому зберіганні та переробці. Фаги, як один із біологічних чинників, впливають на чисельний та видовий склад бактерій та є важливими компонентами біоценозів. Коеволюція фагів та бактерій забезпечує певну рівновагу їх поширення та збереження [1, 2, 3].

Однак однією з важливих властивостей для збереження фагів фітопатогенних бактерій є показник термінів їх біологічної активності в природі. Це зумовлене, зокрема, тим, що у випадку ведення сільськогосподарських робіт такі бактерії не можуть довго зберігатися в ґрунті [4]. Дослідження присвячені попередженню розвитку бактеріозів, ще потребують свого подальшого розвитку, однак показана перспективність проведення біологічного контролю чисельності бактерій за допомогою фагів на практиці [5, 6]. У зв'язку з цим виникає питання вивчення характеристик показників титрів фагів при внесенні лабораторних ізолятів фагів у природні ценози. Використання препаратів фагів для захисту рослин може включати обробку насіння, листя на різних стадіях вегетації. В роботах, присвячених питанням біологічного захисту рослин від бактеріозів, значну увагу приділяють визначенню термінів збереження інфекційності фагів та проведенню заходів, що сприяють їх подовженню [7]. Обробка насіння препаратами фагів може бути важливим профілактичним чинником при агротехнічних заходах попередження розвитку бактеріозів та дозволяє визначити терміни, які є оптимальними для проведення таких робіт.

Метою наших досліджень було визначення термінів зберігання фагів при штучному внесенні на лабораторних об'єктах та в агроценозах.

Матеріали і методи

В роботі використовували шість ізолятів фагів: 7325/4 та 7325/5 *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325; 1025/2 та 1025/3 *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 1025; 216-КС та 216-V2 *Erwinia carotovora* 216, виділених з полів цукрового буряку України. Використані культури фітопатогенних бактерій отримані з колекції музею відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України.

Для визначення характеру змін біологічної активності фагів останні використовували у

титрах 106ПУО/мл та 109ПУО/мл. Дослідження динаміки титрів проводили:

- на скляній поверхні: фаги наносили на стерильне скло чашок Петрі, зберігали при 4 °С та 20 °С. В зазначені строки проводили змив фагів з чашок та титрування. Використаний об'єкт у зв'язку із повідомленнями про те, що на штучних поверхнях фаги швидко інактивуються [8];
- на поверхні листових пластинок цукрового буряку в польових умовах з повторною обробкою на третій день нанесення препарату проводили побутовим розпилювачем. Для стандартизації умов перед титруванням із листових пластин робили висічки діаметром 3 см;
- на поверхні насіння: насіння заливали лізатом фагів на 2 год і просушували, у зазначені терміни заливали фізіологічним розчином на ніч, екстрагували із постійним струшуванням, титрували;
- у вигляді фаголізату при 28 °С: отримані на поживному бульйоні фаголізати на період проведення досліджень залишали в термостаті при 28 °С та аналізували динаміку їх інфекційної активності.

Титри фагів визначали на 1, 3, 6, 12, 24, 50 та 100 день в плямоутворюючих одиницях на мл (ПУО/мл), ЗА Грація [9].

Результати та їх обговорення

Проводилися дослідження, направлені на розробку наукових підходів до створення на основі бактеріофагів біологічних засобів захисту рослин від збудників бактеріозів.

З рослин цукрових буряків виділяли фаги фітопатогенних бактерій та вивчали перспективи їх використання для контролю чисельності патогенної мікрофлори. Як модель використовували шість фагів: 7325/4, 7325/5 *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325, 1025/2, 1025/3 *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 1025, 216-КС та 216-V2 *Erwinia carotovora* 216.

Визначення спектра літичної активності фагів проводили до шістнадцяти штамів фітопатогенних бактерій, що належали до родів *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*. Виявлено, що фаги мають різний спектр літичної активності від полівалентного до вузькоспецифічного.

Вивчення будови віріонів проводили за допомогою електронного мікроскопа EM-125 методом негативного контрастування із застосуванням 2% ФВК (рН 7,0). Досліджувані фаги різнилися за особливостями будови, але всі мали короткий нескоротливий хвостовий відросток, що дало можливість віднести їх до таксономічної групи *Podoviridae*.

Проведено порівняльне вивчення поліпептидного складу ізолятів фагів. Визначено число поліпептидів та молекулярну масу для кожного з них. В структурі віріонів за поліпептидним складом в межах груп виявилась певна подібність.

Для практичного застосування важливими показниками є терміни збереження активності фагів. Швидкість втрати фагами літичної активності варіювала залежно від умов експерименту. Так, в лабораторних умовах на листових пластинках цукрового буряку при 20 °С в перший день титри фагів падали на 2-3 порядки, надалі зменшувались поступово і на 24-й день становили 104 - 105 ПУО/мл, така ж закономірність спостерігалась при використанні початкового титру фагів 106 ПУО/мл.

Температура зберігання листя 4 °С сприяла більш тривалому терміну збереження літичної активності фагів.

Використання скляних поверхонь не впливала на деградацію чи стабілізацію фагових частинок, а, як і в інших дослідах, більше залежала від температури. При 4 °С концентрація фагів через 24 дні знизилась на 2 порядки, при 20 °С суттєве падіння їх титрів починалось на 12-й день.

Використання фаголізатів у польових умовах дозволило встановити, що при обробці листя буряку титри фагів падали значно швидше – в перший же день на 4-5 порядків.

Повторна обробка листя на 3-й день була ефективною тільки для фага 216-КС.

Для насіння цукрового буряку проводили визначення динаміки активності фагів на його по-верхні протягом 100 днів. За цей час титри фагів падають у 100-1000 разів (104 до 102 ПУО/мл для фагів *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325; 103 ПУО/мл для фагів *P. syringae* pv. *atrofaciens*

1025; від 107 до 104 ПУО/мл для фагів *E. carotovora* 216).

Враховували, що інактивація фагів у вищевказаних дослідженнях може відбуватись за рахунок використання обов'язкового етапу – висушування. Останній може приводити до змін, що спричиняють необоротну інактивацію фагів. У зв'язку із чим було окремо проаналізовано, як сприяє стабілізації фагів МПБ. При температурі 28 °С їх титри на 12-й день становили від 104 ПУО/мл до 107 ПУО/мл.

Для оцінки перспектив практичного застосування фагів також були проведені дослідження стабільності вірусів при тривалому зберіганні. Встановлено, що навіть багаторічне збереження фагів при 4 °С забезпечує збереження їх інфекційності без повної інактивації.

У зв'язку з отриманими даними, що вказують на певні обмеження тривалого зберігання біологічно активних фагів, актуальним є продовження досліджень з екології цих фагів у природі. Як відомо, фаги у великій кількості присутні в ґрунті, на поверхні рослин. Так, використовуючи трансмісивну електронну мікроскопію, було встановлено, що в ризосфері цукрового буряку концентрація фагів становить 107 ПУО/мл [10]. Високі концентрації фагів також зустрічаються в наземних екосистемах. Проте існує багато перешкод для більш детального вивчення таких біоценозів. Йдеться про надзвичайно велику кількість різноманітних мікросередовищ, характеристики яких можуть впливати як чинники чисельності фагів: вологість, інтенсивність опадів, сухість повітря, температурні, добові та сезонні зміни тощо. Бактерії мають різноманітні способи пристосування до таких умов існування,

ЛІТЕРАТУРА

1. Abedon S.T., Herschler T.D., Stopar D. Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability // *Appl Environ Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – №9. – P. 4233-4241.
2. Levin, B.R., F.M. Stewart, and L. Chao. Resource-limited growth, competition, and predation: a model and experimental studies with bacteria and bacteriophage // *Am. Nat.* – 1977. – № 111. – P. 3-24.
3. Lenski, R.E., B. Levin. Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities // *Am. Nat.* – 1985. – №125. – P. 585-602.
4. Бойко А.Л., Семчук Л.І., Коломейцева Л.А. та ін. Вивчення властивостей фагів *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *P. syringae* pv. *tabaci* 223 з метою встановлення впливу екологічних факторів на їх популяції // *Вісник КНУ. Серія Біологія.* – 1999. – №29. – С. 54-57.
5. Willson M, Campbell HL, Jones JB, Suslow TV, and Cuppels DA. Biological control of bacterial speck of tomato // *Phytopathology.* – 1997. – V. 86. – P. 49.
6. Flaherty, J.E., Harbaugh, B.K., Jones, J.B., Somodi, G.C., Jackson, L.E. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium // *Hortscience.* – 2001. – V36. – P. 98-100.
7. Balogh, B. Strategies for improving the efficacy of bacteriophages for controlling bacterial spot of tomato. – University of Florida. – 2002.
8. Гвоздяк Р.И. Изучение фитопатогенных бактерий в СССР. Бактериальные болезни растений. – М.: Колос. – 1981. – С. 133-156.
9. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Мир, 1961. – 527 с.
10. Ashelford, K.E., Day, M.J. and Fry, J.C. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil // *Appl Environ Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 285-289.