

UDC 577

## **Determination and Study of Main Biological Features of *Pseudomonas* sp. Phytopathogenic Bacteriophages**

<sup>1</sup>Magda D. Davitashvili<sup>2</sup>Lela Z. Tsiklauri

<sup>1-2</sup>Iakob Gogebashvili Telavi State University, Georgia  
Qartuli University Street 1, Telavi, 2200

<sup>1</sup>Dr. (Biology), Associate Professor

E-mail: magdadav@gmail.com

<sup>2</sup>Dr. (Technical), Assistant Professor

E-mail: l\_wiklauri@yahoo.com

**Abstract.** The article studies main biological features (host range, virion morphology and sensitivity to different environmental factors) of phytopathogenic *Pseudomonas* sp. bacteriophages. Pfl14 and Pfl17 phages were attributed to Syphoviridae family. The resistance of these phages to heating and UV-irradiation, as well as stability in a number of solutions and tapwater was shown. These features are considered important for practical application of phages in natural environment.

**Keywords:** phytopathogens; bacteriophage; latent period; lysis spectrum; biological features.

**Введение.** Современные требования к способам борьбы с бактериозами растений должны быть экономически выгодными и экологически целенаправленными. Они должны способствовать сохранению окружающей среды, питательной цепи и полезной микрофлоры. Поэтому, в развитых странах даётся предпочтение биологическим методам борьбы с вредителями растений, которые основываются на использовании бактерий-антагонистов, бактерий-энтомопатогенов и вирусов, специфических ферментов, фитонцидов, феромонов и других биологически активных веществ [1, 2].

Подобно упомянутым биологическим методам перспективна борьба с бактериальными заболеваниями растений посредством специфичных бактериофагов и их комплексных смесей. Это подтверждается тем, что за последние десятилетия на западе вновь пробуждается интерес к применению в сельскохозяйственной практике фаговых препаратов [3]. Хотя, следует отметить, что это перспективное направление биологического контроля вновь требует детального исследования. Изучение вирусов фитопатогенных бактерий интересно и с теоретической точки зрения, так как оно даёт нам новый фактический материал о структуре и функции бактериофагов, об их генетических особенностях, о зависимости от условий среды и механизмах самозащиты.

Цель нашей работы выделение активных бактериофагов против фитопатогенных бактерий семейства псевдомонас и изучение их биологических свойств.

**Материалы и методы:** бактериальные штаммы. *Pseudomonas* sp. 36 бактериальный штамм, выделен в разных регионах Грузии из картофельных клубней и рассады, в том числе 12 штаммов *P. fluoresce*; *P. aeruginosa* – 4 стандартных штамма и 18 клинических изолятов.

**Бактериофаги.** Фаги выделенные из среды – всего 32 клона, в том числе Pfl14, Pfl17, Pfl19 и другие; бактериофаги *P. Aeruginosa* – P638, P16, P610, P10c, P3c.

Выделение фагов производили методом обогащения из сточных вод и больных растений в различных географических зонах. Первичный материал испытывали на содержание фагов с использованием ориентационного спот-теста, а затем двуслойным методом [4, 5].

Лизисный спектр фагов определяли на устойчивых питательных средах методом модификации Крейджа [6] или по спот-тесту [4, 6]. Рабочий титр подопытного фага составлял  $1-10^8$  частиц/мл.

Точный титр фага и определение формы негативной колонии на данном бактериальном штамме производили двуслойным агарным методом [4, 5].

Морфологию вириона бактериофагов изучали электронными микроскопами JEM-1200CX и Opton-Zeiss 10M. Препараты изготавливали методом негативного контрастирования с использованием 2%-ного раствора уранилацетата.

Изучение фаз взаимодействия с клеткой-хозяином происходило с использованием известных методов [4, 5]. В случае каждого исследуемого фага, определялась интенсивность адсорбции, продолжительность латентного периода и величина среднего выхода.

Чувствительность фагов в отношении физико-химических факторов (температура, pH, ультрафиолетовое излучение, концентрация ионов в растворе и др.) изучали стандартными методами [4, 5, 6].

Стабильность бактериальных вирусов при хранении определяли в различной среде: в LB-бульоне, в водопроводной воде, в дистиллированной воде, в 0,1 М NaCl и фосфатном буфере. Препараты хранили при температуре 4°C и при комнатной температуре.

Размножение и концентрирование бактериофагов производили в жидкой среде со взбалтыванием при 25–30°C, в колбах или на твёрдой среде двуслойным агарным методом; последующее очищение бактериофаговых препаратов производили путём дифференциального центрифугирования (2000 об/мин, 1–1,5ч).

**Результаты и их обсуждение:** Как было отмечено в наших предыдущих публикациях, со взятого с полей и хранилищ восточных и южных регионов Грузии растительного материала – из клубней и рассады картофеля было выделено около двух сотен штаммов фитопатогена. Проверка патогенных качеств в отношении картофеля, а затем в результате изучения их культурально-морфологических и биохимических качеств, исследуемые штаммы были разделены на 3 группы. Во второй группе были объединены бактерии с положительной оксидазной и слабо выраженной ферментационной активностью, которые при искусственном заражении картофельных клубней вызывают, в основном, развитие водянистой гнили. В результате комплексных исследований и с учётом симптомов заболеваний, стала возможной идентификация семейства выделенных микроорганизмов (*Pseudomonas* sp.) и в некоторых случаях и видов (*Pseudomonas fluorescens*).

Как раз созданная на первом этапе исследования коллекция штаммов *Pseudomonas* sp. дала нам возможность выделить против этих бактерий специфичные бактериофаги и изучить их основные биологические характеристики [7, 8].

В отношении фитопатогенных псевдомонад, специфичные бактериофаги, в основном, были выделены из сточных и оросительных вод, а также из речных и озёрных вод. 4 клон были выделены из почвы. Первичные фаговые изоляты (32 изолята) были изучены согласно лизисному спектру и негативной морфологии (на выбранных индикативных штаммах), а также морфологии вириона. Оказалось, что все фаги *Pseudomonas* sp. состояли из головы и хвоста, т.е. относились к классу хвостатых фагов по классификации Аккермана [6]. К тому же, в отличие от популяции фагов *Erwinia* sp., эти фаги оказались одного типа (семейства сифовиридов). Для последующего изучения было оставлено 7 бактериофагов, которые проявляли активность в отношении штаммов *P. fluorescens* (в отношении хоть одного штамма из сборной) и поэтому их назвали фагами серии Pfl. Дополнительно было проведено изучение основных биологических свойств последних, таковые, стабильность лизиса, серологические характеристики, лизисная активность по расширенной схеме, в результате чего Pfl фаги разделились на 2 группы. Для более детальной характеристики выделены из этих групп по одному представителю – бактериофаги Pfl14 и Pfl17, которые проявили широкий лизисный спектр.

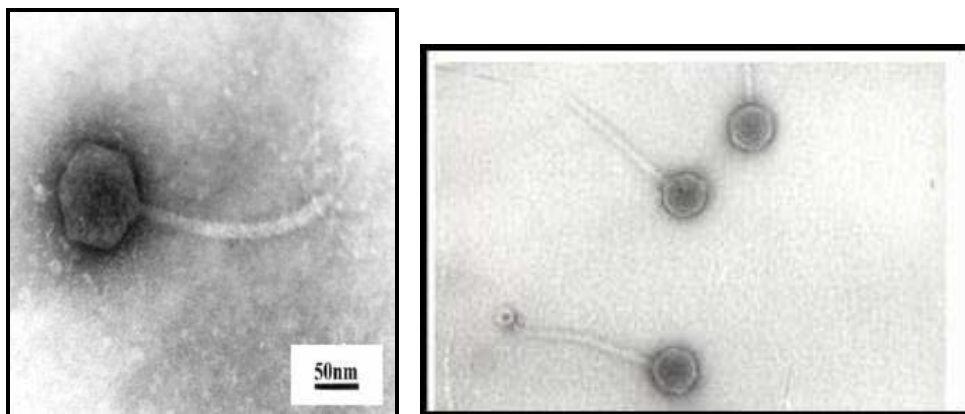


Рис. 1. Морфология вириона специфичных бактериофагов: а) Pfl14; б) Pfl17

Электронно-микроскопическим изучением установлено (картина 1), что вирионы обоих бактериофагов *P. Fluoresce* – Pfl14 и Pfl17 имеют сходное морфологическое строение: гексагональная изометрическая голова и длинный сжимающийся хвост, что их относит к семейству сифовиридов, хотя, отмечается небольшая разница в размерах вирионов отдельных фагов.

Изучены параметры единичного цикла размножения фагов Pfl14 и Pfl17 и установлено, что их характеризует эффективная адсорбция, краткий латентный период и высокий средний выход. Этим подтверждается вирулентная природа фагов Pfl14 и Pfl17, имея ввиду активное нашествие на хозяин-клетку и её необратимое повреждение. Данные внутриклеточного цикла размножения находятся в определённой корреляции к размерам негативной колонии бактериофагов Pfl14 и Pfl17 и морфологии вириона. В частности, бактериофаги с крупной негативной колонией характеризуются сравнительно кратковременным латентным периодом и высоким средним выходом. Подобного рода корреляция и ранее была отмечена разными авторами [4, 9].

Антигенная структура фагов, с таксономической точки зрения, одна из значительных свойств. В опытах были применены две специфические антифаговые сыворотки, из них APS Pfl17 была получена в процессе данного исследования. Проведённые опыты показали, что полученные сыворотки характеризовались нейтрализацией гомо- и гетерологичных фагов с разными параметрами (данные не приводятся). Вместе с тем, показатели перекрёстной нейтрализации фагов были низкие, что указывает на серологические различия исследуемых фагов, хотя, можно предположить, что у фагов Pfl14 и Pfl17 есть хоть один общий антиген.

Таблица 1

**Показатели взаимодействия бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* с хозяин-клеткой**

фаги	Pfl17	Pfl14
Бактериальный штамм	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i>
Время максимальной адсорбции (мин)	12	10
Процент адсорбции	80	86
Латентный период (мин)	25	23
Лизисное время (мин)	12	18
Выход фагов (частицы/кл.)	102	110

Известно, что для оценки функционирования структурных компонентов бактериофагов имеет большое значение изучение ограничивающего воздействия на них ряда химико-физических факторов [10, 11]. Исследованиями выявлена устойчивость фитопатогенных псевдомонадных фагов в отношении органических растворителей (спирт, хлороформ), что указывает на отсутствие в их вирионах липидных компонентов. Изучение зависимости бактериофагов от температуры (таблица 2) показало, что бактериофаги

псевдомонас почти полностью сохраняют жизнедеятельность при нагреве до 50°C в условиях стандартной 10-минутной экспозиции. Нагрев до 65°C вызывает снижение жизнеспособности фагов в 4 раза и более. Исследуемый бактериофаг показал нам устойчивость фагов Pfl14 и Pfl17 к ультрафиолетовому излучению, что очень значительно для сохранения жизнеспособности популяции фагов в природных условиях.

Таблица 2

### Термоинаktivация бактериофагов *P. Fluorescens*

фаги	45°C	55°C	65°C	70°C
Pfl17	92,1	54,3	8,9	0
Pfl14	90,5	48,0	4,2	0

\*Содержание жизнеспособных фаговых частиц (%) после 10-минутной экспозиции

Опыты кислотно-щелочной денатурации фитопатогенов бактериофагов картофеля показали довольно высокую стабильность фагов Pfl14 и Pfl17 в интервалах pH 5-10, одновременно они оказались более чувствительными перед высокими показателями щелочности. Изучение других физиологических свойств, таких как чувствительность к цитратам натрия и осмическому шоку, выявили разницу между фагами. Фаги Pfl14 и Pfl17 испытывают малую степень инаktivации в присутствии 2,5 % цитрата натрия, что указывает на зависимость этих фагов от двухвалентных ионов, являющихся кофакторами адсорбции. Одновременно псевдомонадные бактериофаги совершенно не реагируют на обстоятельства, вызывающие осмосный шок. Была изучена стабильность исследуемых псевдомонадных бактериофагов в различных условиях хранения (таблица 3).

Таблица 3

### Стабильность бактериофагов *P. Fluorescens* в различных средах при хранении 4°C

фаги	Время хранения	LB бульон	M9	физиологический раствор	Ф. Р. * Ф. Б. **	SM-буфер	водопроводная вода	Дистиллированная вода
Pfl17	96 часов	98,9	97,8	97,9	99,0	97,6	98,0	96,4
	1 квартал	97,7	97,5	96,0	95,3	96,1	96,4	92,2
	1 месяц	84,6	88,2	84,4	90,5	94,7	80,4	76,4
	6 месяцев	57,1	52,9	12,3	41,8	56,4	45,6	10,8
Pfl14	96 часов	95,6	96,9	94,7	97,0	96,1	94,6	92,0
	1 квартал	88,1	91,2	84,7	90,3	91,8	90,0	83,9
	1 месяц	79,3	81,5	63,7	67,9	64,9	81,5	55,6
	6 месяцев	50,5	49,6	8,2	56,1	56,7	41,9	7,9

\*Процентное содержание жизнеспособных фаговых частиц (%)

\*\*Фосфатный буфер 0,1 MNaCl

Оказалось, что активность концентрированных препаратов фагов Pfl14 и Pfl17 мало изменялась в течение 6 месяцев. Титры фагов оказались самыми стабильными при хранении в богатой почве (LB бульон), за этим следует синтетическая среда M9, SM-буфер и буферизованный физиологический раствор. Фаги, хранившиеся в водопроводной воде, в основном, удовлетворительно сохраняют свою активность, что очень значительно для приготовления рабочих смесей из фаговых концентратов в полевых условиях и в условиях хранилища.

Активность бактериофагов снижалась при взаимодействии с некоторыми антибактериальными препаратами, с такими как, в частности, медный купорос.

Одновременно, фунгицид фундазол, так же, как антибиотик стрептомицин сульфат (концентрацией 200 мкг/мл) не оказывал заметного влияния на титр фага. Следовательно, стало ясно, что в случае необходимости одновременного применения химических препаратов и бактериофагов, каждая конкретная комбинация подлежит рассмотрению.

#### Примечания:

1. Chkhubianishvili, T., Andronikashvili, M. J. Exp. Biol. Med., 1997, 23, 23-26.
2. Zhao BoGuang, Jing ZhiGao, Wang KeShan, Li YaoSan. Scientia Silvae Sinicae, 1996, 32, 348-353.
3. Jackson, L.E. H-mutant control of harmful plant bacteria. 1999, Agriphi, Inc., UT, Project of US Department of Agriculture.
4. Abedon, S.T., Herschler, T.D., Stopar, D. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67, 4233-4241.
5. Chanishvili N., Chanishvili T., Tediashvili M. and Barrow P.A. Phages and their application aginst drug-resistant bacteria. Review. J. Che., Technol. Biotechnol, 2001, 76, p. 689-699.
6. Ackermann H.W. Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol. Sci., 1987, V.4, No.7, p. 214-218.
7. Давиташвили М., Тедиашвили, Хухунашвили Т., Коберидзе Т., Лашхи Н., Церцвадзе Г., Хурцია Б., Чанишвили Т. Известия Академии Наук Грузии, сер. биол., 2000, Т. 26, №4-6. С. 331-337.
8. Давиташвили М., Тедиашвили, Хухунашвили Т., Баларджишвили Н., Лашхи Н., Коберидзе Т., Чанишвили Т., Церцвадзе Г., Элиашвили Т. Известия Академии Наук Грузии, сер. биол., 2000, т. 26, №4-6. С. 339-345.
9. Adams, M. Bacteriophages. 1961.
10. Габрилович М.И. Основы бактериофагии. Минск. «Высшейшая школа», 1973. С. 150.
11. Чанишвили Т.Г. Автореф. дисс. докт. наук, 1969.

#### References:

1. Davitashvili M., Tediashvili, Khukhunashvili T., Koberidze T., Lashkhi N., Tsertsvadze G., Khurtsiya B., Chanishvili T. Izvestiya Akademii Nauk Gruzii, ser. biol., 2000, T. 26, №4-6. S. 331-337.
2. Davitashvili M., Tediashvili, Khukhunashvili T., Balardzhishvili N., Lashkhi N., Koberidze T., Chanishvili T., Tsertsvadze G., Eliashvili T. Izvestiya Akademii Nauk Gruzii, ser. biol., 2000, t. 26, №4-6. S. 339-345.
3. Adams, M. Bacteriophages. 1961.
4. Gabrilovich M.I. Osnovy bakteriofagii. Minsk. «Vyssheishaya shkola», 1973. S. 150.
5. Chanishvili T.G. Avtoref. diss. dokt. nauk, 1969.

УДК 577

### Выделение бактериофагов активных к *Pseudomonas* sp. фитопатогенным бактериям и изучение их биологических свойств

<sup>1</sup> Магда Давидовна Давиташвили

<sup>2</sup> Лела Зурабовна Циклаури

<sup>1,2</sup> Телавский государственный университет, Грузия  
2200, г. Телави, ул. Картули Университети, 1

<sup>1</sup> Доктор биологических наук, ассоциированный профессор  
E-mail: magdadav@gmail.com

<sup>2</sup> Доктор технических наук, ассистент профессор  
E-mail: l\_wiklauri@yahoo.com

**Аннотация.** Были изучены биологические свойства (круг хозяев, морфология вириона, а также отношение к различным факторам внешней среды) бактериофагов, специфичных к *Pseudomonas* sp., выделенных из различных источников внешней среды. Pfl14 и Pfl17 фаги отнесены к семейству Syphoviridae. Была показана устойчивость этих фагов к нагреванию и ультрафиолетовому излучению, а также их выраженная стабильность в ряде растворов и водопроводной воде, что является важным фактором для их использования в естественных условиях.

**Ключевые слова:** фитопатогены; бактериофаги; латентный период; лизисный спектр; биологические свойства.