

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри вірусології,

д.б.н., проф. Будзанівська І.Г.

Протокол № _____ засідання кафедри

Від «__» _____ 2024 р.

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГІВ *P. SYRINGAE PV. TABACI*
*223 TA P. SAVASTANOI PV. PHASEOLICOLA 4013***

Кваліфікаційна робота магістра

денної форми навчання

за спеціальністю «Біологія»

Мінчук Оксани Сергіївни

Науковий керівник від кафедри

к.б.н., доцент Андрійчук О.М.

Роботу виконано на базі кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ імені Тараса Шевченка.

Під керівництвом к.б.н., доцента Андрійчук Олени Миколаївни

Оцінка захисту роботи _____

Київ - 2024 р.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
РОЗДІЛ 1. Використання бактеріофагів як біопестицидів у рослинництві.....	6
1.1. Бактеріальні захворювання рослин.....	6
1.2. Бактеріофаги як альтернатива агрохімікатам в боротьбі проти фітопатогенних бактерій.....	8
1.2.1. Переваги використання фагових коктейлів як засобів біоконтролю фітопатогенів.....	10
1.2.2. Застосування бактеріофагів з іншими протимікробними засобами.....	11
1.3. Потенційні проблеми використання бактеріофагів для боротьби з бактеріальними захворюваннями рослин.....	12
1.4. Сучасний стан виробництва та застосування препаратів бактеріофагів проти фітопатогенних бактерій.....	15
1.5. Фагова терапія для тварин.....	17
1.6. Бактеріофаги на поверхнях.....	21
1.7. Бактеріофаги в біоремедіації.....	23
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	25
2.1. Об'єкти досліджень.....	25
2.1.1. Віруси.....	25
2.1.2. Бактерія.....	25
2.2. Метод виснаженого штриха.....	25
2.3. Титрування бактеріофагів методом подвійних агарових шарів за Грація....	26
2.4. Spot-тест.....	28
2.5. Отримання чистих ліній бактеріофага.....	29
2.6. Диференційне центрифугування.....	30
2.7. Електронна мікроскопія.....	30
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення.....	32

3.1. Виділення бактерій і бактеріофагів	32
3.2. Морфологія негативних колоній отриманих бактеріофагів.....	33
3.3. Результати електронної мікроскопії.....	35
3.4. Зміна літичної активності ізолятів при проведенні пасажів на <i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4013.....	39
3.5. Порівняння ефективності посіву фагів на різних штаммах бактеріальних культур.....	42
ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	47

ВСТУП

Вирощування сільськогосподарських рослинних культур забирає величезний обсяг економічних та людських ресурсів. При цьому приблизно третина того, що вирощується, потрапляє на звалище. Певна частина гниє на складах під час зберігання та на полицях магазинів під час продажу, іншу викидають на смітник споживачі, але суттєву частину відходів складає врожай, втрачений через шкідників, в тому числі, фітопатогенних бактерій.

Бактеріальні хвороби є проблемою для багатьох агрокультур по всьому світу, зокрема для томатів, картоплі, арахісу, тютюну тощо. Їх збудниками виступають бактерії, які так само швидко набувають стійкості до пестицидів, як людські патогени – до антибіотиків. І так само, як у випадку з людськими патогенами, виникає негайна потреба звернутися до «ворогів» бактерій – бактеріофагів. На відміну від пестицидів та антибіотиків, бактеріофаги високоспецифічні – «вбивають» лише певний вид або навіть штам бактерії, не впливаючи на корисну мікрофлору – в кишечнику, в ґрунті, будь-де.

Їх використання є ефективним заходом боротьби з низкою руйнівних бактеріальних хвороб сільськогосподарських культур. Фаговий біоконтроль має переваги перед хімічним контролем, оскільки спеціально виготовлені фагові коктейлі можуть бути адаптовані для націлювання на певні бактерії, що викликають захворювання. На відміну від хімічних заходів контролю, фагові суміші можна легко адаптувати до стійкості бактерій, яка може розвиватися з часом.

У зв'язку із вищенаведеним метою роботи було провести порівняльну характеристику фагів *P. syringae* pv. *tabaci* 223 та *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013 та визначити ефективність посіву ізолятів фагів за умов зміни бактерій-хазяїв з використанням двох штамів *Pseudomonas*.

Завданням роботи було:

- Порівняти морфологічні характеристики виділених ізолятів бактеріофагів.
- Провести аналіз спектру літичної активності ізолятів бактеріофагів.
- Дослідити ефективність посіву ізолятів фагів на двох штаммах *Pseudomonas*.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Бактеріальні захворювання рослин

Незважаючи на те, що бактерії вважаються структурно простими, вони надзвичайно різноманітні з точки зору метаболізму і зустрічаються майже скрізь на Землі у величезній кількості. Є як корисні, так і хвороботворні бактерії. Перші беруть участь у таких різноманітних процесах, як травлення у тварин, фіксація азоту в коренеплодах деяких бобових, розклад тваринних і рослинних решток та інше. З іншого боку, хвороботворні бактерії викликають важкі і часто смертельні захворювання у людей, тварин і рослин. Першим бактеріальним захворюванням, яке коли-небудь було виявлено, була сибірська виразка (викликана *Bacillus anthracis*) великої рогатої худоби та овець у 1876 році. Після відкриття сибірської виразки у великої рогатої худоби одразу послідувало відкриття збудника бактеріального опіку груші та яблуні (викликаного *Erwinia amylovora*) Burrill в 1883 році [1].

Фітопатогени представлені грампозитивними та грамнегативними бактеріями і мікоплазмами. Серед грамнегативних збудників найчастіше зустрічаються бактерії родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Agrobacterium* та *Erwinia*, серед грампозитивних – бактерії родів *Clavibacter*, *Carynebacterium*, *Streptomyces*.

Бактеріальні захворювання можна згрупувати в категорії залежно від ступеня ураження рослинної тканини та симптомів, що вони викликають, які можуть включати судинне в'янення, некроз, м'яку гниль, пухлини тощо. Судинне в'янення виникає внаслідок проникнення бактерій у судинну систему рослини. Подальше розмноження та блокування перешкоджає переміщенню

(транслокації) води та поживних речовин через ксилему рослини-хазяїна. Може відбутися в'янення у наземної частини рослини або її загибель. Фітопатогенні бактерії можуть викликати некроз, виділяючи токсини. Симптоми включають утворення плям на листі, плямистості на стеблах або раку рослин. Хвороби м'якої гнилі викликаються патогенами, які виділяють ферменти, здатні ушкоджувати клітинну стінку, тим самим руйнуючи структуру рослинної тканини, тобто тканина стає мацерованою (м'якою і водянистою). М'які гнилі зазвичай виникають на овочах, таких як картопля, морква, баклажани, кабачки, помідори та інші. Пухлинні захворювання викликаються бактеріями, які стимулюють неконтрольоване розмноження рослинних клітин, в результаті чого утворюються великі структури, що називаються галлами [2].

Фітопатогенні бактерії наносять серйозних втрат фермерським господарствам. Один з таких фітопатогенів - це *Erwinia amylovora*. Вона є γ-протеобактеріальним збудником, що не тільки наносить серйозні економічні збитки фермерам, але й має історичне значення. Це була перша бактерія, яка була відкрита як причина захворювання рослин, і тому вважається першим описаним фітопатогеном. Вона легко поширюється комахами, особливо тими, які запилюють квіти, а також може поширюватися вітром. Вона уражає рослини родини *Rosaceae* [3]. Захворювання викликане *Erwinia amylovora* зареєстровано в 40 країнах Північної Америки, Європи, Тихоокеанського регіону та Близького Сходу [4]. Це сильно впливає на виробництво яблук і груш у кількох регіонах, а витрати оцінюються в 100 мільйонів доларів на рік у США через втрати виробництва та заходи контролю [5].

Також, такими є види роду *Xanthomonas*, що викликають захворювання практично у всіх економічно важливих культур: апельсин, маніока, томати, перець, хрестоцвіті, бавовна, рис, боби та виноград є прикладами рослин-хазяїв, які зазвичай уражаються. Бактерії є паличкоподібними γ-протеобактеріями, поширеними по всьому світу і легко поширюються через дощі, вітри,

забруднений рослинний матеріал та сільськогосподарські знаряддя [6]. Заходи боротьби обмежуються застосуванням міді в польових умовах, що все ще не дає бажаного результату. Крім того, використання сполук міді дало перші докази утворення персистентних клітин у *Xanthomonas* [7].

Pseudomonas syringae – це γ -протеобактерія, яка існує у всьому світі. Це передусім епіфітний умовно-патогенний мікроорганізм, який живе на здорових поверхнях рослин, навіть на рослинах, які не є хазяями [8]. Організм *Pseudomonas syringae* викликає хворобу, відому як «бактеріальний рак». *Pseudomonas syringae*, проникає в рослини через пошкоджену кору, також через рану, що утворюється в результаті неправильного обрізання гілок або через заражене насіння [9].

Ці, а також інші фітопатогенні бактерії наносять непоправних збитків аграріям по всьому світі. Розроблені методи обробки рослин проти них не завжди дають бажаний результат. Отже, пошук дієвих засобів боротьби з фітопатогенними бактеріями є дуже актуальним питанням на даний час.

1.2. Бактеріофаги як альтернатива агрохімікатам в боротьбі проти фітопатогенних бактерій

Як вже загадувалось, фітопатогени є основною проблемою для сільськогосподарського виробництва у всьому світі. Вони спричиняють величезні втрати під час збору, зберігання та транспортування врожаю. Підраховано, що в усьому світі від рослинних хвороб щорічно втрачається 20–30% врожаю [10]. Серед фітопатогенів налічується понад 200 видів фітобактерій [11]. Хоча для боротьби з цими фітопатогенами застосовувалися різні стратегії, вони залишаються проблемою для сільськогосподарських виробництв.

Найбільш часто використовуваними стратегіями контролю є антибіотики (наприклад, стрептоміцин) і сполуки на основі міді . Проте широке використання антибіотиків призвело до резистентності серед кількох фітопатогенів [12,13]. Стійкість до стрептоміцину спостерігалася у родів *Erwinia*, *Pseudomonas* і *Xanthomonas spp* [14,15,16,17].

Бактеріофаги - це віруси, які вибірково інфікують бактеріальні клітини та клітини архей. Інтерес до бактеріофагів як агентів біоконтролю пояснюється їх нетоксичною природою для еукаріотичних клітин, самореплікацією, високою специфічністю, здатністю долати резистентність і простотою виробництва [18]. Найбільш вирішальними детермінантами потенційної застосовності бактеріофагів як агентів біоконтролю є те, чи є бактеріофаг літичним або лізогенним (помірним) і специфічністю для хазяїна. Помірні бактеріофаги інфікують клітини-хазяї і або зберігаються у вигляді епісом, або інтегруються в геном хазяїна, що призводить до утворення профага [19]. У стані профага пригнічуються різні гени бактеріофага, таким чином інгібуючи експресію білків, які викликають збірку віріонів і лізис бактеріальних клітин [20]. Профаг реплікується разом з бактеріальним геномом, проте він може перейти до літичного циклу. Літичні бактеріофаги інфікують і використовують метаболізм клітини-хазяїна для реплікації, що призводить до лізису клітини-хазяїна та вивільнення фагових віріонів. Вивільнені віріони можуть потім інфікувати подібні бактерії. Загальновизнано, що лізогенних фагів слід уникати, оскільки багато помірних бактеріофагів можуть спричинити поширення патогенних генів шляхом трансдукції, також певні помірні бактеріофаги мають гени, які можуть перетворити їх бактерії-хазяї на більш патогенні тощо [19].

1.2.1. Переваги використання фагових коктейлів як засобів біоконтролю фітопатогенів

Одна з особливостей бактеріофагів, що відрізняє їх від антибіотиків, полягає в тому, що вони є високоспецифічними. Деякі бактеріофаги настільки специфічні, що інфікують лише один або кілька штамів бактерій одного виду. Ця функція корисна для підтримки мікробної екосистеми, але вимагає використання фагових сумішей (коктейлів) як агентів біоконтролю через генетичне різноманіття фітопатогенних бактерій. Фагові коктейлі зазвичай використовуються з двох основних причин.

По-перше, вони використовуються для націлювання на широкий спектр бактерій (або різні види, що викликають подібне захворювання, або різні штами одного виду) [21]. Як вже писалось вище, бактеріофаги високоспецифічні, таким чином, це обмежує застосування одного бактеріофага при націленні на різні фітопатогенні бактерії в польових умовах. В результаті з кількох бактеріофагів різних хазяїв можна створити коктейль, який розширить діапазон, що дає змогу ефективніше знищувати шкідників.

По-друге, фагові коктейлі використовуються для запобігання розвитку фагорезистентних бактерій. Постійна гонка озброєнь між бактеріофагами та бактеріями призвела до розвитку множинних механізмів резистентності до бактеріофагів у бактерій, таких як пригнічення адсорбції фагів, абортівна інфекція, імунна система CRISPR/Cas та системи рестрикції-модифікації [22]. Наприклад, стійкість до бактеріофагів у *R. solanacearum* стала очевидною приблизно через 30 годин після додавання бактеріофага в культуру [23]. Використовуючи більше ніж один тип бактеріофагу, цільові бактерії не розвиватимуть стійкість до всіх бактеріофагів одночасно.

Крім того, для подолання стійкості бактерій до бактеріофагів був розроблений запатентований процес, що включає приготування суміші

мутантних бактеріофагів (h-) діапазону хазяїв. Н-мутантні бактеріофаги демонструють ширший внутрішньовидовий діапазон, включаючи штами бактерій, які стійкі до батьківських бактеріофагів і зберігають специфічність щодо бактерій дикого типу [24]. Суміш з п'яти мутантних бактеріофагів була створена для боротьби з бактеріальним опіком у герані, спричиненою *X. campestris pv. pelargonii*. Ці h-мутанти лізували всі 21 тестованих штами *X. campestris pv. pelargonii* [25]. Крім того, щоденне застосування суміші бактеріофагів ефективно контролювало поширення бактеріального опіку у герані в тепличних умовах. Ця дослідницька група також використовувала подібну стратегію для позакореневого внесення в якості біологічного контролю бактеріальної плямистості, спричиненої *X. campestris pv. vesicatoria* у томата [26]. Результат показав, що застосування бактеріофагів стабільно знижувало захворюваність і тяжкість бактеріальної плямистості. Крім того, рослина, оброблена бактеріофагами, також давала значно вищі врожаї, ніж необроблені рослини або рослини, оброблені бактерицидом міді/манкоцебу.

1.2.2. Застосування бактеріофагів з іншими протимікробними засобами

Комбінація бактеріофагів з іншими антимікробними засобами, що сприяють зниженню захворюваності рослин, такими як індуктори системи набутої резистентності рослин (SAR) та антибіотики, показала хороші результати. У 2005 році Obradović оцінювали вплив комбінації індукторів SAR з іншими агентами біоконтролю на бактеріальну хворобу томатів, спричинену *X. campestris pv. vesicatoria* в тепличних експериментах. Вони з'ясували, що застосування бактеріофагів у поєднанні з ацибензолар-S-метилом пригнічує видиму гіперчутливість, викликану ацибензолар-S-метилом, і забезпечує чудову

ефективність контролю захворювання [27]. Подібний підхід був також проведений для боротьби з бактеріальним опіком цибулі, спричиненим *X. axonopodis* pv. *allii* в польових умовах. Дійсно, лікування сумішшю бактеріофагів разом з ацибензолар-S-метилом зменшило тяжкість захворювання на 50% порівняно з 31% від лікування гідроксидом міді та манкоцебом [28]. В тепличних умовах інтеграція бактеріофага КФ1 і гідроксиду міді значно зменшила кількість уражень на листках перцю, викликаних *X. euvesicatoria* (приблизно на 81%, 90% і 88% для трьох окремих випробувань). Хоча немає статистичної різниці в контрольній ефективності лікування гідроксидом міді окремо, його лікування разом із бактеріофагом значно зменшило кількість уражень [29].

1.3. Потенційні проблеми використання бактеріофагів для боротьби з бактеріальними захворюваннями рослин

Незважаючи на те, що багато лабораторних аналізів показали значний потенціал бактеріофагів як засобів для біоконтролю, застосування бактеріофагів для боротьби з хворобами рослин у польових умовах все ще потребує більшого вдосконалення для подолання певних обмежень. Бактеріофаги в основному вносили безпосередньо в ризосферу шляхом поливання ґрунту або розпилювали на філосферу рослин. Гілл і Абедон [30] виявили кілька факторів, що впливають на успіх фаготерапії в обох середовищах.

Для прикладу, філосфера не є безпечним місцем і призводить до різкого скорочення популяції бактеріофагів [31; 32]. Багато досліджень у польових і лабораторних умовах продемонстрували, що бактеріофаги легко інактивуються під впливом високої температури, високого та низького рН та опромінення сонячним світлом (особливо спектру UV-A та UV-B) [29]. В умовах відкритого

грунту популяція сумішей бактеріофагів швидко зменшувалася та практично ліквідувалася через 36-48 год після обприскування [34]. Короткочасна персистенція бактеріофагів на поверхні листка є основним обмеженням застосування філосфер-бактеріофагів. Було досліджено кілька підходів для підвищення ефективності боротьби з патогенами рослин у філосфері. Інкапсульовані бактеріофаги з певним складом, таким як кукурудзяне борошно, знежирене молоко, казеїн, сахароза, конго-червоний і лігнін [35, 36, 31, 37, 38]; використання бактерій-носіїв для розмноження бактеріофагів у цільовому середовищі [39, 40, 41] або лікування рано вранці або ввечері [31,33] показали багатообіцяючі результати щодо довговічності бактеріофагів та ефективності лікування бактеріофагами. На ефективність контролю бактеріофагового лікування також може впливати багато інших факторів: бактеріальна флора, щільність бактеріофагів, швидкість розпаду віріонів, терміни лікування та навколишнє середовище [30].

Додатковою проблемою біологічного контролю з використанням бактеріофагів у сільському господарстві є низька кореляція між характеристиками бактеріофагів *in vitro*, такими як діапазон хазяїв, розмір бляшок, а також літична активність *in vitro* та фактична ефективність контролю в польових умовах [42, 43, 29]. Справді, в той час як біопробы *in vitro* показали стабільність до різних факторів навколишнього середовища та зменшили симптоми захворювання на листках цибулі-порей проти *P. syringae* pv. *porri*, немає суттєвої різниці між обробленими бактеріофагами та необробленими рослинами в польових випробуваннях [44]. Використання бактеріофагу ФRSL1, який не швидко знищував клітини *in vitro*, порівняно з іншими ізольованими літичними бактеріофагами, які швидко вбивали *in vitro*, показало ефективний контроль над популяцією *R. solanacearum*, а також рухом у корені томата [23]. Крім того, його захисна здатність проти *R. solanacearum* зберігалася протягом 4

місяців, тоді як інші високолітичні бактеріофаги не спричиняли подібних захисних ефектів рослин [45].

Ефективне застосування фагів залежить від їх стабільності. Температура є найбільш значущим фактором, що впливає на стабільність фага, оскільки вона впливає на проліферацію, дію та збереження фагів [59]. Інші фактори, що впливають на стабільність фагів, включають методи, що використовуються для виготовлення фагових композицій, речовини та компоненти, які вони містять, форми, в яких вони використовуються, умови збереження, що зберігаються, та методи застосування [60]. Проблему нестабільності фагів при неправильних умовах зберігання можна вирішити, підтримуючи фаги в холоді і захищеному від світла місці. Таким чином, фагові коктейлі можуть зберігатися місяцями без значної втрати титру. Також, залежно від типу бактеріофага, вони можуть бути заморожені з бактерією, що розмножується, або без неї [61].

Альтернативний підхід до вирішення проблеми нестабільності фагів через неналежні умови зберігання передбачає отримання стабільної біорецептури, що супроводжується перетворенням препарату фага з рідкого стану в порошкоподібний. Такий спосіб приготування дозволяє фаговим складам витримувати суворі умови навколишнього середовища протягом тривалого часу [62]. Практичне дослідження було проведено Leung et al. (2018) для оцінки стабільності бактеріофагів у формі порошку при зберіганні при температурі навколишнього середовища. Згідно з результатами цього дослідження, порошок бактеріофага, висушений розпиленням, може успішно зберігатися до одного року у вакуумній упаковці при температурі 4 °C і 20 °C [63]. Подібним чином Chang et al. (2019) провели дослідження, щоб вивчити стабільність зберігання порошку фагів у нормальних умовах навколишнього середовища. Згідно з результатами цього дослідження, висушені порошки фагів фізично та біологічно стійкі при тривалому зберіганні при навколишній температурі [64].

Отже, численні дослідження потенційного застосування бактеріофагів у разі боротьби з бактеріальними захворюваннями були вивчені та отримали багато позитивних результатів. Проте успішне застосування бактеріофагів проводилося в контрольованих умовах в той час як сільськогосподарське виробництво в основному відбувається на відкритих полях, де чинники навколишнього середовища постійно мінливі та неконтрольовані. Тому для повної картини ефективності бактеріофагів у відкритих умовах необхідно провести більше польових випробувань.

1.4. Сучасний стан виробництва та застосування препаратів бактеріофагів проти фітопатогенних бактерій

Протягом останніх десятиліть було опубліковано не мало результатів досліджень, та незважаючи на це існує небагато комерційних продуктів на основі бактеріофагів, які вийшли на ринок для боротьби з бактеріальними хворобами рослин [11]. Американська компанія Omnilytics була першою компанією, яка отримала реєстрацію (від Агентства з охорони навколишнього середовища США) на свій біопестицидний продукт на основі фагів Agriphage. Продукт призначений для боротьби з бактеріальною плямистістю або плямистістю томатів і перців (є специфічними для *X. campestris* pv. *vesicatoria*, або *P. syringae* pv. *tomato*) [46]. Угорська компанія Enviroinvest стала другою компанією, яка отримала реєстрацію на свій біопестицид під назвою Erwiphage для боротьби з бактеріальним опіком яблунь (є специфічним для *Erwinia amylovora*) [47]. Існує також шотландська компанія APS biocontrol, яка розробила промивний розчин на основі бактеріофагів (Biolyse) для бульб картоплі, який буде використовуватися для профілактики хвороби м'якої гнилі (специфічний проти м'якої гнилі *Enterobacteriaceae*) під час зберігання [48].

Цікаво, що цей продукт, як повідомляється, використовується мережею супермаркетів Tesco [49].

Однак, у деяких регіонах світу існують деякі незручності, які необхідно подолати щодо законодавства, що дозволяє використовувати підходи фагового біоконтролю для боротьби з бактеріальними хворобами рослин. Проблема бактеріофаг-опосередкованого біоконтролю полягає в тому, що фагові суміші/коктейлі необхідно постійно оновлювати, щоб лізувати якомога більше нових штамів цільової бактерії. Цей підхід використовується Omnilytics [50]. Це дозволяє адаптувати фаговий коктейль до відповідних хвороботворних бактеріальних штамів у певній ситуації, а також полегшує протидію будь-якому розвитку фагової резистентності під час застосування бактеріофагу. Однак регламенти ЄС вимагають, щоб будь-яка зміна одного з компонентів фагового коктейлю вимагала перереєстрації, яка потребує часу та витрат, що робить зараз такий підхід як в США нездійсненним в ЄС [51]. Для кращого застосування та ефективності фагових продуктів як біопестицидів може знадобитися перегляд і внесення змін до законодавства, що регулює фаговий біоконтроль.

Також, розробка стандартних критеріїв відбору бактеріофагів потребує більшої уваги для подальшого розвитку фаготерапії. Багато досліджень продемонстрували, що поточні критерії можуть бути ефективними не у всіх випадках використання бактеріофагів [45, 23, 44]. Нині для боротьби з хворобами рослин використовуються лише літичні бактеріофаги, але все ще залишається великий знак питання щодо потенціалу та ризику помірних бактеріофагів. Хоча помірні бактеріофаги не розглядаються, як агенти для боротьби з хворобами рослин, через їх цикл реплікації, вони можуть бути модифіковані, щоб стати вірулентними або працювати як засіб доставки генетичних елементів для відновлення антимікробної чутливості чи порушення фактора вірулентності [39]. Більше того, у випадку виявлення патогенів на основі бактеріофагів, сконструйовані бактеріофаги мають на меті ввести

маркерний ген у цільовий бактеріальний геном. Тому, незалежно від того, чи є репортерні бактеріофаги літичними або лізогенними, вони все одно потенційно виявляють цільовий бактеріальний патоген [52].

Отже, хоча агрохімікати, такі як антибіотики та мідь, все ще використовуються в основному для боротьби з бактеріальними хворобами рослин у польових умовах, існує значний потенціал використання бактеріофагів для зменшення кількості агрохімікатів або їх заміни для боротьби з бактеріальними хворобами рослин. Подальші дослідження бактеріофагів та їх впливу на фітопатогенні бактерії є необхідними для пошуку більш ефективних та безпечних аналогів у боротьбі з останніми.

1.5. Фагова терапія для тварин

Введення фагів є важливою альтернативою антибіотикам у тварин. Повідомлялося про багато експериментів *in vitro* проти патогенних бактерій, що заражають тварин.

У фермерських господарствах фаготерапія була впроваджена для лікування та профілактики інфекцій, спричинених серотипом *Salmonella enterica* Kentucky та *Escherichia coli* у курей. Два серотипи *S. enterica* Kentucky і три фаги *E. coli* O119 змогли знизити смертність з 30% в позитивних контрольних групах до 0% у пролікованих курчат. Примітно, що більш високе зниження кількості бактерій у сліпій кишці, серці та печінці було отримано на 23-й день [65].

Нещодавно коктейль з бактеріофагів використовували проти синьогнійної палички, яка викликає риносинусит у овець. Суміш чотирьох фагів змогла зменшити біомасу біоплівки на слизовій оболонці лобового синуса в концентрації 10^8 – 10^{10} БУО/мл без занепокоєння щодо безпеки [66].

Кілька моделей мишачого маститу показали, що фагова терапія також може бути використана проти золотистого стафілокока при маститі великої рогатої худоби, спричиненому мікробною інфекцією [67,68,69]. Попереднє дослідження, опубліковане в 2006 році Gill et al., аналізувало ефективність 5-денного лікування, що складається з фага K, що вводиться інтрамаммарно, у лактуючих корів голштинської породи з субклінічним маститом, викликаним *S. aureus*. Три з 18 тварин лужали (16,7%) порівняно з жодною з 20 корів негативної контрольної групи (0%) [70]. Незважаючи на певний успіх, низьку ефективність можна пояснити даними Gill et al., які показують, що інкубація *S. Aureus* з сироваткою та сироваткою великої рогатої худоби призводила до інгібування лізису фагів K. Відповідно, вони дійшли висновку, що білки можуть стерично блокувати прикріплення фага K до бактерії, припускаючи, що *S. Aureus* може бути більш стійким до фагів *in vivo* при інфекціях маститу, ніж в експериментах *in vitro* [71].

Інфекції, спричинені *E. Coli* O157:H7, та лікування фаговою терапією у жуйних тварин вже були розглянуті [72], що виявило, що подальше розуміння введення фагів, ефективна множинність інфекції (MOI) та правильний аналіз результатів необхідні у фаговій терапії великої рогатої худоби [73,74,75]. У овець не було виявлено значного зниження рівня *кишкової палички* O157:H7 порівняно з контролем при введенні одного фага після пероральної інокуляції *E. Coli* [76,77]. Однак суміш двох фагів зменшувала більш ніж на 99% присутність *кишкової палички* у нижніх відділах кишкового тракту тварин, які отримували лікування [78]. Крім того, коктейль з восьми фагів значно знижував рівень *E. Coli* O157:H7 у калі, хоча і не в рубці, через 24 год після введення фага [79].

У дослідженнях поросят фаги були здатні вбивати метицилін-резистентний *S. aureus* (MRSA) *in vitro*, але не спостерігалось зменшення слизової оболонки носа *in vivo* або *ex vivo* [80]. Цей факт підкреслює важливість врахування інших факторів, які можуть протидіяти ефективності фагів *in vivo*,

таких як зниження адгезії або підвищений кліренс рідинами тваринного походження. Однак експерименти, проведені на вирощуванні свиней, показали, що дієтична добавка з комерційним коктейлем фагів проти *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *E. coli* та *Clostridium prefringens* була більш ефективною, ніж пробіотики як стимулятори росту [81], покращуючи, серед іншого, засвоюваність їжі, добовий приріст та приріст на корм.

Наявність ран є відносно поширеним явищем у свиней. Гідрогель, що містить фаги проти *Acinetobacter baumannii*, був використаний для зменшення ранових інфекцій на моделі шкіри свиней *ex vivo* і досяг зниження кількості бактерій на 90% вже через 4 год лікування [82].

Інше дослідження показало, що сім фагів, виділених зі свиноферм у Великій Британії, змогли лізувати всі 68 протестованих штамів *Salmonella*, включаючи MDR, пропонуючи цінну альтернативу протимікробним препаратам для зменшення інфекцій та харчових отруєнь [83].

Інший недавній огляд [84] узагальнив відомі фаги, що заражають личинок *Paenibacillus*. Ця спороутворююча бактерія атакує личинок медоносних бджіл, викликаючи американський гнилець, який є найпоширенішим і згубним з хвороб розплоду медоносних бджіл, здатний знищити цілу колонію всього за три тижні. Важливо, що всі відомі на сьогоднішній день бактеріофаги проти личинок *P.* є лізогенними. Незважаючи на це, дослідження фагової терапії *in vitro* та у вуликах показали вищі показники виживаності груп пацієнтів, які отримували лікування, включаючи профілактичні переваги. Відсутність успіху в деяких випадках пояснювалася лізогенною природою фагів або їх нездатністю отримати доступ до кишечника.

В аквакультурі короп звичайний був використаний як модель для демонстрації ефективності фагової терапії проти *Citrobacter freundii* з використанням одного фага, IME-JL8. Ця бактерія відноситься до нормальної флори риб; однак це було пов'язано із системною інфекцією звичайного коропа

та іншими захворюваннями у різних риб. Введення фагів коропу знижувало прозапальні цитокіни та захищало рибу від інфекції при введенні фагів через годину після інокуляції бактерій, але не через 24 год, що вказує на те, що час має значення у фаговій терапії [85]. Аналогічним чином, фаг ETP-1 у даніо *perio* (*Danio rerio*) не викликав побічної запальної реакції, а дванадцять днів впливу ETP-1 змогли збільшити виживаність з 18% у контрольній групі до 68% після інфікування бактеріями *Edwardsiella tarda* [86]. Інший приклад можна зустріти у північноафриканського сома (*Clarias gariepinus*). Виразкові ураження, спричинені *P. aeruginosa* у північноафриканських сомів, зменшилися в сім разів порівняно з нелікованим контролем після 8–10 днів лікування одним фагом [87]. Крім того, лікування двома різними фагами при MOI 100 досягало 100% виживання у в'єтнамського смугастого сома (*Pangasianodon hypophthalmus*), інфікованого *Aeromonas hydrophila*, який спричиняє геморагічну септицемію, порівняно з 13% виживаності в контрольній групі [88].

Vibrio sp. призводить до загибелі личинок двостулкових моллюсків, а бактеріофаги можуть бути використані як агенти біоконтролю в інкубаторах устриць. Для вирішення цієї проблеми описано два різні підходи. Перший полягає в прямому лікуванні фагами, що складається з двох фагів, що знизило рівень смертності з 77,9% у контрольній групі до 28,2% вже через 24 год інкубації [89]. Однак другий підхід фокусується на знезараженні мікроводоростей як векторів зараження культур личинок *Vibrio* sp. Введення фагів у мікроводоростей призвело до значного зменшення *Vibrio* sp. протягом 2 год, що свідчить про те, що годування личинок знезараженими мікроводоростями може бути перспективним профілактичним методом для уникнення зараження личинок двостулкових моллюсків [90]. Цікаво, що у 2019 році було проведено дослідження з використанням гетерологічного вектора експресії проти *Vibrio parahaemolyticus*. Дріжджі *Pichia pastoris* X-33 експресували фаговий ендолізін Vplys60 з бактеріофага qdv001, а фермент

пригнічував утворення біоплівки та знижував рівень смертності ракоподібних *Artemia franciscana* [91]. В інших дослідженнях лікування двома фагами проти інфекції *Vibrio anguillarum* було ефективним через 72 год у личинок даніо [92], а коктейль із трьох фагів, виділених зі стічних вод, показав специфічність хазяїна проти восьми штамів *Vibrio coralliilyticus* та штаму *Vibrio tubiashii*, отримавши зниження більш ніж на 90% у *V. coralliilyticus* порівняно з необробленим контролем [93].

Ці дослідження показують, що поточні результати є більш перспективними в аквакультурі, ніж на фермах. Необхідні додаткові дослідження, щоб з'ясувати реальний санітарний та економічний потенціал терапії на основі фагів. Цілком можливо, що, як це відбувається у людей, кращі результати можна було б отримати при змішуванні фагів і антибіотиків завдяки синергетичному ефекту.

1.6. Бактеріофаги на поверхнях

Бактерії здатні прикріплюватися до різних поверхонь, таких як скло, метали, полімери, харчові продукти, а також до інших організмів [94]. Найбільший ризик забруднення харчових продуктів знаходиться на поверхнях, що контактують з ними. З цієї причини біоплівки мають велике значення в харчовій промисловості, оскільки вони можуть псувати обладнання та забруднювати їжу, збільшуючи витрати на виробництво [95]. Взаємодія між бактеріями та поверхнями харчової промисловості починається з неспецифічної адгезії і закінчується специфічними спайками та утворенням біоплівки [96].

Salmonella fimbriae полегшують прикріплення, а наявність целюлози посилює утворення біоплівки на певних абіотичних поверхнях [97]. У 2019 році Islam et al. виділили три літичні фаги широкого спектру, LPSTLL, LPST94 і

LPST153, зі зразків води в навколишньому середовищі. Коктейль зменшив біоплівки *сальмонели* на 44–63% на мікропланшетах із 96 лунками. На харчових оброблюваних поверхнях, таких як нержавіюча сталь, коктейль зміг зменшити клітини біоплівки до 6,42 log КУО [98]. Примітно, що Sadekuzzaman et al. показали, що бактеріофаги зменшують кількість *Salmonella* у біоплівках вже після двох годин лікування на 3 та 2 log КУО/см² на нержавіючій сталі та гумі відповідно, тоді як прилиплі життєздатні клітини на салаті були знижені приблизно на 1 log КУО/см² [99]. Gong et al. продемонстрували, що коктейль із шести фагів зміг зменшити на 84,2% популяцію *Salmonella* на черевиках робітників (що важливо для запобігання повторному забрудненню топленої їжі) у середовищі рендерингу-обробки. Це зниження посилювалося в комбінації з гіпохлоритом натрію (92,9%) і скрабуванням (93,2%) після триразового лікування протягом одного тижня [100]. Цікаво, що було продемонстровано синергетичний ефект у комбінації бактеріофагів та хлору зі зменшенням росту біоплівки на 94% та здатністю видаляти вже існуючі біоплівки на 88%, тоді як сам по собі хлор не міг їх усунути [101].

Pseudomonas є найбільш часто повідомленим родом бактерій, що зустрічаються після санітарної обробки на поверхнях для обробки харчових продуктів. Цей рід здатний чинити опір в нішах з поживними речовинами, матеріалами поверхні, температурами і стресовими факторами, які є проблематичними для інших бактерій, таких як машини, підлоги, стоки або нержавіюча сталь [102]. Magin et al. протестували 14.1 і LUZ7 фаги, виділені з питної та термальної води, проти 24-годинних старих біоплівок, що продукуються штамами *P. aeruginosa* PAO1 і D1. Результати показали, що лікування фагами призвело до зниження на 1,7 log КУО/см² бактерій у біоплівках, що утворюються на поверхні нержавіючої сталі, порівняно з необробленими біоплівками [103].

В цілому, бактеріофагимають перспективи в зменшенні утворення нових біоплівок, але, що найважливіше, у видаленні вже існуючих у поєднанні з іншими агентами.

1.7. Бактеріофаги в біоремедіації

Велика частина вуглеводнів, що забруднюють воду, може бути використана в якості джерела вуглецю великою кількістю бактерій, таких як *P. aeruginosa*, яка здатна розкласти моноароматичні вуглеводні [104] або з видами роду *Rhodococcus*, здатними розкласти циклогексан [105]. Нещодавні дослідження виявили бактерії з більш ніж 79 родів, здатних розкласти нафтові вуглеводні [106]. Використання мікроорганізмів у біоремедіації ґрунтується на мікробній петлі. Основна роль мікробної петлі - швидкий CO_2 виробництва і переробки азоту і фосфору в навколишньому середовищі [107]. Rosenberg et al. перевірили ефективність двох біореакторів з комбінаціями бактерій/фагів у різних концентраціях для очищення дренажних вод з ізраїльського нафтового терміналу. Їх дослідження показало загальне скорочення органічного вуглецю на 85% в біореакторі з меншою кількістю бактеріофагів і на 90% відновлення при більш високій концентрації фагів в порівнянні з контролем, що підтверджує концепцію мікробної петлі, керованої фагами [108]. Фаги можуть іммобілізувати деяку кількість азоту або фосфору, але основний вплив викликається лізисом бактерій і вивільненням компонентів у воду у вигляді розчиненого органічного вуглецю, тим самим збільшуючи ріст бактерій [108, 109].

З іншого боку, фаги також були протестовані, щоб допомогти в обробці активного мулу, наповнювача та піноутворення. Khainar et al. виділили

специфічні бактеріофаги проти нокардіоформ на активному муловому процесі. Активність трьох фагів, нанесених в коктейль на реакторі лабораторного масштабу, знижувала піноутворення [110]. Choi et al. виділили бактеріофаг зі стічних вод, що інфікує *Sphaerotilus natans*, який, як відомо, викликає ниткоподібне наповнювач у системах очищення стічних вод, і їхні результати показали, що застосування фагів зменшує індекс об'єму мулу та каламутність супернатанту, що вказує на те, що фаги можуть бути використані і в цьому аспекті [111].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти досліджень

2.1.1. Віруси

В дослідженні були використані ізоляти бактеріофагів, виділені із овочів з проявами симптомів бактеріального ураження на поверхні плодів.

2.1.2. Бактерія

Бактеріальна культура, що була об'єктом дослідження – це бактерії роду *Pseudomonas*. *Pseudomonas* — рід бактерій типу протеобактерій, що включає кілька відомих патогенів рослин, наприклад *P. syringae*, опортуністичних патогенів людини, наприклад *P. aeruginosa*, ґрунтову бактерію *P. putida*, і деякі види, які викликають псування непастеризованого молока й іншої молочної продукції.

2.2. Метод виснаженого штриха

Для отримання поодиноких колоній бактеріальної культури використовували метод виснаженого штриха.

Поживне середовище, дотримуючись всіх правил стерильності, розливали в чашки Петрі. Після цього дали середовищу застигнути при кімнатній

температурі й розділили чашку на чотири сектори. Потім за допомогою бактеріальної петлі на поверхню середовища в перший сектор наносили краплю мікробної зависі та розсіювали його штрихом, далі послідовно засівали всі інші три сектори матеріалом, що залишився на петлі. Засіяну чашку підписали та поставили в термостат. Оптимальна температура для розмноження більшості фітопатогенних бактерій – 20-25°C. Через добу проводили облік результатів. В першому секторі спостерігали суцільний ріст по штриху, а з кожним наступним штрихом відбувається зменшення кількості бактерій, що засіваються, і в останньому секторі спостерігалися поодинокі колонії. Усі маніпуляції проводили біля полум'я пальника (у радіусі 15 - 20 см) швидко, щоб не забруднювати культуру сторонніми мікроорганізмами.

2.3. Титрування бактеріофагів методом подвійних агарових шарів за Грація

Для титрування бактеріофага існують різні методи, однак найбільшого поширення набув метод агарових шарів за Грація – титрування на твердих середовищах.

Метод титрування вірусів бактерій на агаризованих середовищах запропонував бельгійський вчений Андре Грація в 1936 р. для визначення кількості активних фагових часток у одиниці об'єму вихідного фаголізату. Такий метод дозволяє зробити точний підрахунок інфекційно-активних одиниць бактеріофага за утворенням негативних колоній на газоні чутливої культури-хазяїна в результаті лізису бактеріальних клітин після розмноження вірусів всередині них. Метод полягає у використанні нижнього щільного шару агару (1,4%) для живлення бактерій, а верхнього м'якого шару агару (0,7%) – для розвитку інфекційної системи «бактеріофаг – бактерія». Полегшена дифузія

фагових часток завдяки зниженій концентрації агару забезпечує циклічність інфекційного процесу, коли кожна генерація потомства бактеріофагів після лізису клітини-хазяїна здатна інфікувати сусідні клітини. У результаті цього від одного віріона утворюється одна прозора зона відсутності росту бактерій – негативна колонія. Для достовірності визначення титру фага проводять серію повторюваних дослідів із ряду розведень вихідного фаголізату, а результати підрахунку кількості негативних колоній кожного експерименту усереднюють з урахуванням розведення і об'єму внесеного матеріалу [53].

Для постановки експерименту використовували 1,4%-й агар, що був попередньо приготований, в чашки Петрі в кількості 2,5-3,0 мл. Чашки із середовищем підсушували 30 хв у термостаті. Підготовлене середовище повинно бути абсолютно сухим, тому що навіть незначе зволоження може змінити кількісні показники вмісту фагових частинок.

Напіврідкий 0,7%-й агар, розлитий у пробірки по 2,5 мл і простерилізований у них, також був приготовлений напередодні постановки досліду. Перед використанням цей агар витримували на водяній бані за температури +45°C.

У день постановки досліду з рідини, що містить бактеріофаг, готували у пробірках ряд послідовних розведень, використовуючи стерильний ізотонічний розчин натрію хлориду (0,5%-й NaCl). Досліджуваний фаг титрували методом 10-кратних розведень. В 12 пробірок вносили по 4,5 мл фіз. розчину та додавали 0,5 мл фага в першу пробірку. Вміст пробірки перемішували новою піпеткою і 0,5 мл рідини переносили у другу пробірку, з другої – в третю і так далі до десятої включно. Із десятої пробірки зайві 0,5 мл виливали у дезінфекційний розчин. Одинадцята і дванадцята пробірки – контрольні. Потім у пробірки з 0,7%-м агаром, розплавленим на водяній бані і охолодженим до температури 40°C, доливали по 1 мл вже розведеного бактеріофагу і 0,2 мл бактеріальної культури. Після чого ретельно перемішували вміст пробірки, перекочуючи її між

долонями, і виливали на чашки Петрі із вже застигнутим шаром нижнього агару, рівномірно розподіляючи суміш по його поверхні. Після охолодження середовища чашки з посівом інкубували при 26°C протягом ночі.

Облік результатів титрування показує, що при великій концентрації фагу спостерігається суцільний лізис культур - чашки прозорі. В тих розведеннях фагу, де спостерігається зменшення кількості фагу, з'являються окремі ізольовані негативні колонії, які можна підрахувати.

Для статистичної достовірності кожен дослід проводили тричі, а результати підрахунку усереднювали.

2.4. Spot-тест

S

В лабораторній практиці метод spot-тесту для визначення титру бактеріофагу є найбільш розповсюдженим, оскільки він є менш енергозатратним, не потребує великої кількості матеріалу, його можна зробити за відносно короткий проміжок часу, а також він простий у виконанні, порівняно з іншими.

Для постановки spot-тесту нам знадобилась одна чашка Петрі, яку ми розкреслили на 9 секторів. Після чого залили її 1,4%-й агаром, що був попередньо приготований, в кількості 2,5-3,0 мл. Чашки із середовищем підсушували 30 хв у термостаті. Потім в пробірку наливали 2,5 мл розплавленого на водяній бані 0,7%-ного агару та охолоджували до 40°C після чого додавали 200 мкл бактеріальної культури. Вміст пробірки нашаровували на нижній 1,4%-й агар. Після застигання верхнього шару наносили по 10 мкл вірусовмісного матеріалу, що був попередньо розведений. Розводили таким чином: в 9 пробірок вносили по 4,5 мл фіз. розчину та додавали 0,5 мл фага в першу пробірку. Вміст пробірки перемішували новою піпеткою і 0,5 мл рідини

переносили у другу пробірку, з другої – в третю і так далі до восьмої включно. Із восьмої пробірки зайві 0,5 мл виливали у дезінфекційний розчин. Дев'ята – контроль.

Після нанесення вірусовмісного матеріалу, чашки Петрі залишали на 30 хв при кімнатній температурі, для того, щоб бактеріофаг мав змогу дифундувати в товщу агару. В кінці постановки чашки ставили на інкубацію (в термостат на ніч при 26°C) [54].

При зчитуванні результатів спостерігали зони лізису. Остання лунка, де був лізис, була титром досліджуваного бактеріофагу.

2.5. Отримання чистих ліній бактеріофага

В даному дослідженні чисту лінію бактеріофага отримували шляхом багаторазових пасажів окремих негативних колоній. Після кожного пасажу фаголізат обробляли та титрували методом агарових шарів (див. пункт 2.3).

Для виділення чистої лінії бактеріофагу відбирали найбільш ізольовані бляшки на бактеріальному газоні та проштрикували бляшку кінцівкою самплера. Суспендували в невеликій кількості середовища (200 мкл-1 мл). Висівали бактеріофаг методом подвійних агарових шарів за Грація. Чашки інкубували протягом доби.

Далі в кожну чашку заливали 6 мл фізіологічного розчину та ставили в холодильник на 30 хв. Далі скляним шпателем обережно відшарувати верхній агар від нижнього й переносили його разом з доданим фізіологічним розчином в чисту колбу. Для екстракції фага вміст колби гомогенізували на магнітній мішалці до однорідної маси протягом 1 години. Гомогенат переносили в центрифужні пробірки, врівноважували і центрифугували [55].

2.6. Диференційне центрифугування

Для того щоб звільнити вірус від компонентів поживного середовища, залишків зруйнованих бактерій та продуктів їх життєдіяльності ми використовували диференційне центрифугування.

Перший етап – це низькошвидкісне центрифугування, де гомогенат центрифугували при 5000 об\хв протягом 20 хв. В отриманий надосад додавали хлороформ у співвідношенні 1:2 та кілька разів струшували. Збирали верхню фазу та знову центрифугували (5000 об\хв, 20 хв). Після центрифугування надосадову рідину обережно зливали в стерильні пробірки, а осад (бактеріальні клітини та їх компоненти) переносили у дезінфекційний розчин. Надосадову рідину переносили в центрифужні пробірки й урівноважували після чого проводили високошвидкісне центрифугування при 37000 об\хв протягом 120 хв при температурі 4°C (центрифуга УЦП-65, ротор РКС-50, 100000g). Після центрифугування надосадову рідину видаляють, а бактеріофаг у вигляді осаду на дні пробірки ресуспендували у 200 мкл фізрозчину. Далі концентрований фаговий препарат переносили в стерильні пробірки типу «Епендорф» і зберігали в холодильнику [55].

2.7. Електронна мікроскопія

Електронна мікроскопія – один із основних методів дослідження вірусів. Електронна мікроскопія ґрунтується на використанні потоку електронів, який подібно до світлового променя, рухаючись у вакуумі, поширюється прямолінійно, а під дією електромагнітного поля відхиляється від початкового напрямку. Теоретично роздільна здатність електронного мікроскопа становить

0,002 нм; реальна роздільна здатність сучасних мікроскопів наближається до 0,01 нм. На практиці роздільна здатність для біологічних об'єктів досягає 2 нм. На сьогодні використовують два типи електронних мікроскопів. Просвічувальний електронний мікроскоп являє собою колону, через яку у вакуумі проходять електрони, випромінювані катодною ниткою. Пучок електронів, який фокусується кільцевими магнітами, проходить через підготовлений зразок. Характер розсіювання електронів залежить від щільності зразка. За електронами, що проходять через зразок, спостерігають на флюоресцентному екрані та реєструють результати за допомогою фотопластинки. Скануючий електронний мікроскоп застосовують для отримання тривимірного зображення поверхні досліджуваного об'єкта.

Плівки із формвару наносили на спеціальні опорні сітки з міді. Це забезпечувало механічну міцність підкладки під час електронного бомбардування. На готову сіточку-підкладку наносили краплю суспензії бактеріофагів. Через 2 хв рідку фазу видаляли фільтрувальним папером. При цьому не можна допускати повного висихання поверхні підкладки. Адсорбовані на плівці фагові частинки відразу ж обробляли контрастером – 2% (w/v) уранілацетат, рН 4-4,5 і витримували 30 с. Після цього залишки контрастеру забирали фільтрувальним папером, препарат підсушували. Морфологічні особливості бактеріофагів вивчали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу (JEOL 1400, інструментальне збільшення $\times 40\,000$ - $90\,000$) [56].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виділення бактерій і бактеріофагів

В процесі досліджень було проаналізовано широкий спектр зразків, в яких потенційно могли бути виявлені активні бактеріофаги, до яких чутливі представники роду *Pseudomonas*. Зразки отримували зі змивів овочевих культур (зокрема, картоплі, моркви, перцю, цукрового буряку) із симптомами ураження у вигляді гнилі. Овочеві культури відбиралися у межах Київської області.

У ході дослідження було виділено чотири ізоляти бактеріофагу, названі, відповідно, 223/4, 7591/1, 7591/2, 7591/3. Всі вони були використані в подальших маніпуляціях. Для виділення фагів з досліджуваних зразків їх звільняли від бактерій шляхом пропускання через бактеріальні фільтри з діаметром пори в 1 мкм та обробки суспензії хлороформом (у співвідношенні 1:2) протягом 1-2 год.

Використані нами бактерії роду *Pseudomonas* були лабораторними штамами. Фітопатогенні бактерії надані з колекцій: з відділу фітопатогенних бактерій (музей Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України).

3.2. Морфологія негативних колоній отриманих бактеріофагів

На культуральних чашках ізоляти фагів утворювали бляшки, що суттєво не відрізнялися за розміром і морфологією. Усі фаги утворювали круглі прозорі бляшки, не оточені ореолом.

Морфологію бляшок фагів 223/4 можна спостерігати на рисунку 3.1. Було показано, що кожен окремий фаг може продукувати одну відносно велику і прозору бляшку протягом 24 годин. Діаметр колоній на культурі складав приблизно $5-7 \pm 1$ мм.

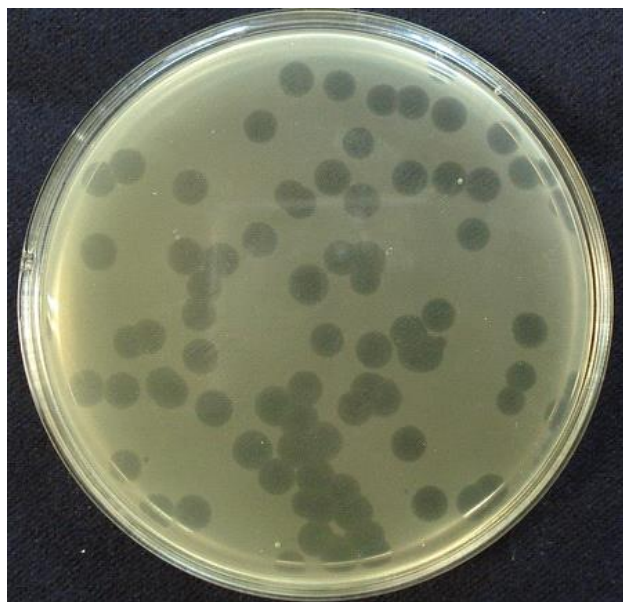


Рис. 3.1. Морфологія негативних колоній ізоляту фагу 223/4

Бактеріофаг 7591/3 утворював менші негативні колонії, порівняно з попереднім ізолятом, але такі ж прозорі, як і ізолят 223/4, що показано на рисунку 3.2. Негативні колонії залишалися такими ж після 24 годин інкубації. Діаметр колоній складав $2-5 \pm 0,5$ мм.

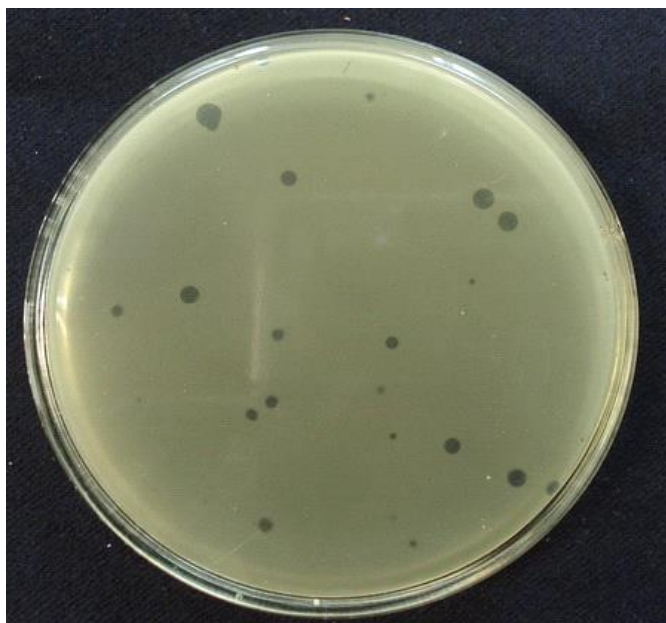


Рис. 3.2. Морфологія негативних колоній ізоляту фагу 7591/3

Щодо фагів 7591/1 та 7591/2, то за своєю морфологією вони були схожі на ізолят 223/4 та формували велику і прозору бляшку без ореолу, що можна спостерігати на рисунках 3.3 та 3.4 відповідно. Фаги інкубувались протягом 24 годин. Діаметр колоній ізоляту 7591/1 - $4-7 \pm 1$ мм, а 7591/2 – $5-7 \pm 1$ мм.

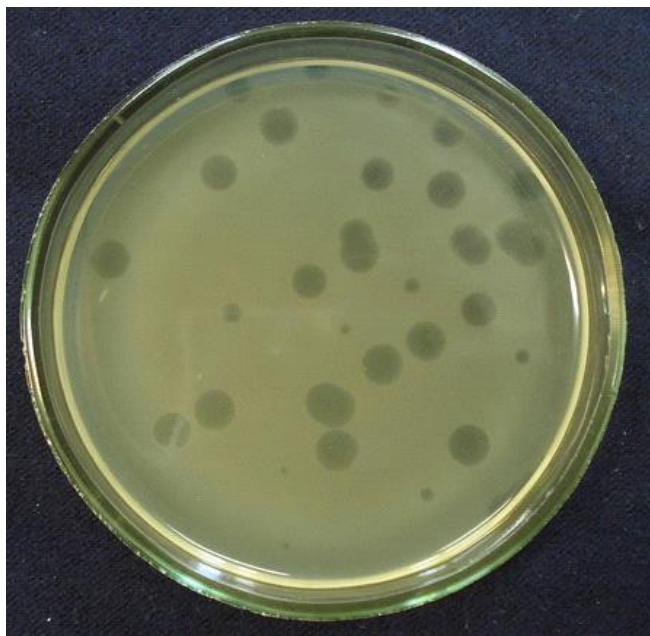


Рис. 3.3. Морфологія негативних колоній ізоляту фагу 7591/1

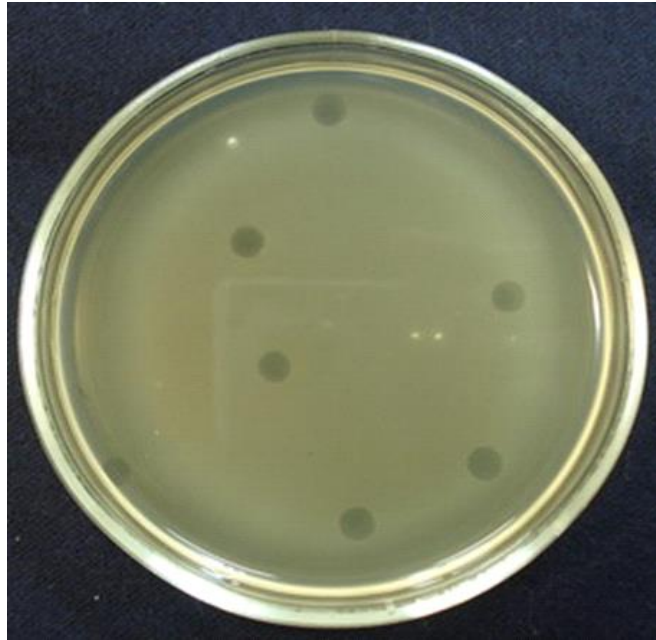


Рис. 3.4. Морфологія негативних колоній ізоляту фагу 7591/2

Отже, більшість негативних колоній мали схожу морфологію, що може свідчити про їхню належність до однієї родини. Для подальшої, більш точної, ідентифікації необхідно провести електронну мікроскопію ізолятів.

3.3. Результати електронної мікроскопії

Для подальшої ідентифікації на ізольованих фагах проводили електронну мікроскопію.

На рисунку 3.5 зображено бактеріофаг 223/4. Із даного зображення видно, що бактеріофаг має невеликий ікосаедричний віріон та короткий хвостовий відросток, що не скорочується. Діаметр віріону бактеріофага становить близько 60 ± 3 нм, а хвостового відростку 15 ± 2 нм. Ці дані дають змогу зробити висновок, що даний бактеріофаг відноситься до подовірусів.

Подоподібні бактеріофаги — це віруси, які часто асоціюються з T7-подібними фагами. У цій родині налічується 130 видів, віднесених до 3 підродин і 52 родів. Ця родина характеризується дуже короткими хвостами, що не скорочуються.

Подовіруси не мають оболонки, мають ікосаедричну геометрію. Діаметр становить близько 50 ± 2 нм [58] і складається з 72 капсомерів. Головний білок має молекулярну масу ~ 38 кілоДальтон і присутній у кількості 460 копій на віріон. Існує 9 структурних білків. Хвостовий відросток нескоротливий і має 6 коротких субтермінальних волокон. Він товстий, стержнеподібний і побудований із складених один на одного дисків. Максимальна довжина ~ 17 нм [58].

Дволанцюговий геном ДНК є лінійним, має довжину близько 40-42 кб [58] і кодує ~ 55 генів. Вміст гуаніну + цитозину $\sim 50\%$. Він має термінально надлишкові послідовності. За вагою геном становить $\sim 50\%$ вірона. Геном кодує 9 структурних білків, ДНК-полімерази типу аденільованої трансферази В і РНК-полімерази. Три внутрішніх білка утворюють полімеразний комплекс. Виділяють два класи генів (ранні та пізні). Ця класифікація базується на транскрипції, яка регулюється в часі. Гени зі спорідненими функціями згруповані разом. Реплікація геному є двонаправленою.

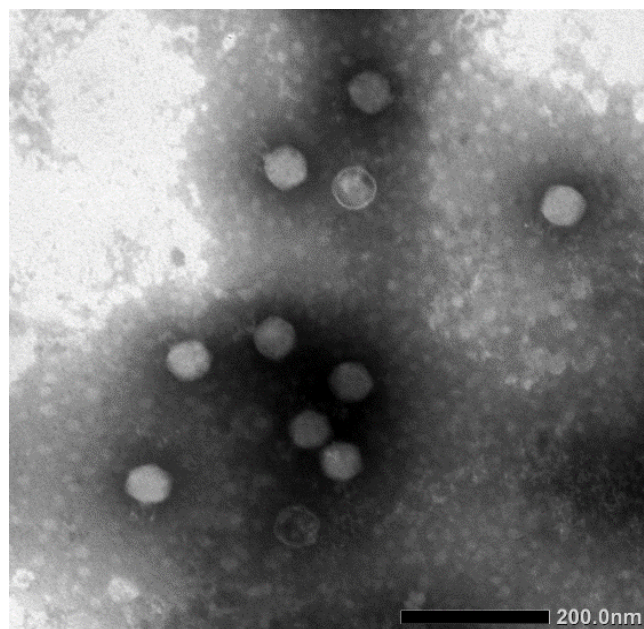


Рис. 3.5. Електронно - мікроскопічне зображення бактеріофагу 223/4

Після використання методу ЕМ ізолят 7591/1 (рисунок 3.6) мав ікосаедричний віріон розміром – приблизно 60 ± 3 нм та хвостовий відросток біля 15 ± 2 нм, що також вказує на те, що бактеріофаг належить до подоподібних вірусів як і попередній.

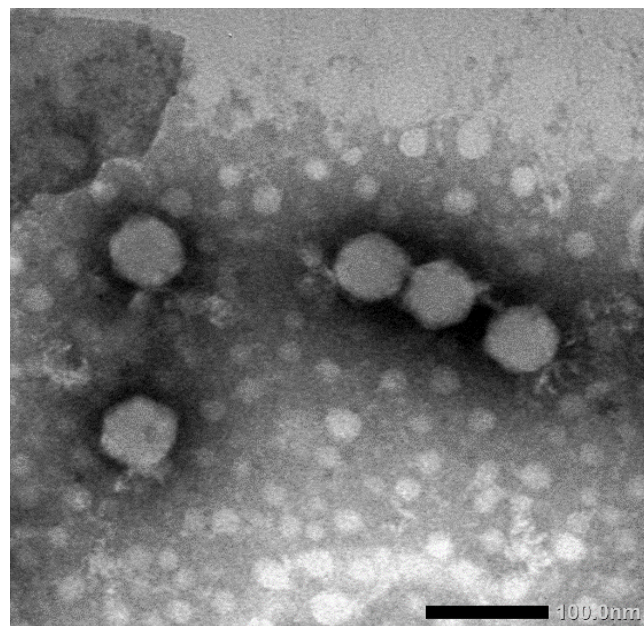


Рис. 3.6. Електронно - мікроскопічне зображення бактеріофагу 7591/1

Також електронна мікроскопія була проведена зі зразком 7591/2 (рисунок 3.7), завдяки чому спостерігали ікосаедричний віріон та короткий хвостовий відросток, довжина яких становила 60 ± 3 нм та 15 ± 2 нм відповідно. Цей ізолят також належить до подоподібних вірусів.

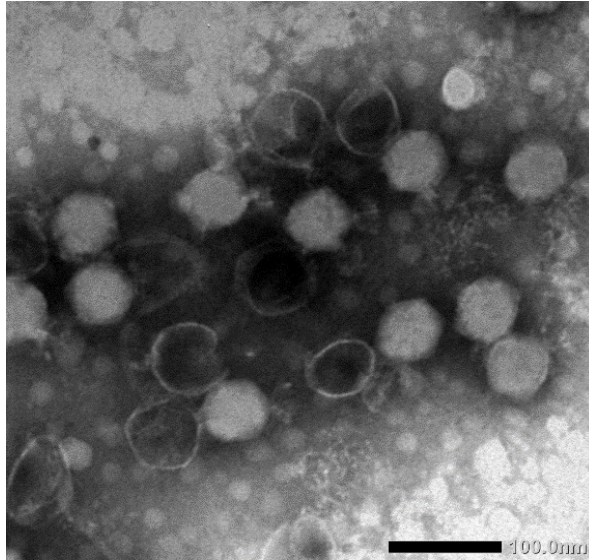


Рис. 3.7. Електронно - мікроскопічне зображення бактеріофагу 7591/2

Мікроскопія останнього ізоляту 7591/3 (рисунок 3.8) дала такі результати ікосаедричний віріон розміром 50 ± 2 нм та хвостовий відросток - 10 ± 1 нм, що також свідчить про належність до подоподібних вірусів.

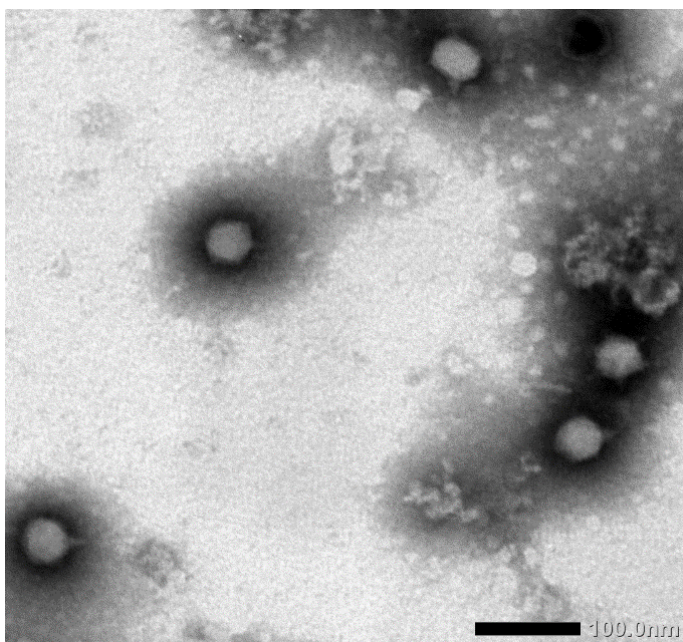


Рис. 3.8. Електронно - мікроскопічне зображення бактеріофагу 7591/3

Отже, отримані за допомогою електронної мікроскопії дані показали, що всі досліджувані ізоляти належать до подоподібних вірусів, що підтвердило припущення належності даних бактеріофагів до однієї родини. Для визначення підродин даних бактеріофагів потрібно застосовувати методи молекулярної біології такі як полімеразна ланцюгова реакція та секвенування геному.

3.4. Зміна літичної активності ізолятів при проведенні пасажів на *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013

Було перевірено літичну активність ізолятів на бактерії *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013. Відомо, що фітопатогенні бактерії *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* завдають значних втрат аграрному сектору багатьох країн, у тому числі і України. Значна шкодочинність цих видів зумовлюється тим, що вони здатні уражувати широке коло рослин, зокрема і бобові культури. Загально

прийнято, що представники родини *Fabaceae* складають значну частину посівів рослинництва багатьох країн, оскільки є цінними продовольчими і кормовими культурами. Пошук альтернативних методів боротьби з даною фітопатогенною бактерією є досить актуальним.

На таблиці 3.1 зображено літичну активність ізолятів бактеріофагів на бактерії *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, де «+» – наявність літичної активності, «-» – відсутність літичної активності. Всі ізоляти проявили літичну активність при пасажуванні, однак, як видно з даних таблиці, найбільш активним був ізолят 223/4, оскільки утворював негативні колонії при перших трьох пасажах. Також ізолят 7591/2 проявив активність в першому та другому пасажах, що робить його другим в даному рейтингу. Було також виявлено, що ізоляти 7591/1 та 7591/3, проявили літичну активність лише при перших пасажах.

У свіжевідібраних пробах був наявний певний спектр фагів. Вони, зокрема, виявлялися на штаммах *P. syringae* pv. *tabaci* 223 та *P. syringae lachrymans* 7591. Із проб, які виявляли літичну активність на перших етапах до *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, в жодній пробі не вдалось виділити стабільні ізоляти фагів. На перших пасажах вони виявляли зони лізису (біологічну активність), але втрачали свою активність після наступних пасажів.

Таблиця 3.1.

Літична активність ізолятів при проведенні пасажів
на *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013

Фаг	Літична активність					
	I	II	III	IV	V	VI
223/4	+	+	+	-	-	-
7591/1	+	-	-	-	-	-
7591/2	+	+	-	-	-	-
7591/3	+	-	-	-	-	-

Отже, високу літичну активність проявив ізолят 223/4, що свідчить про його високі антибактеріальні властивості.

Порівняння “диких” фагів, що були виділені з природи з ізолятами, отриманими після адаптації до певної бактерії дає можливість виявити модифікації, зумовлені хазяїном, які можуть формуватись внаслідок адаптації. Ці модифікації дозволяють прослідкувати етапи можливої коеволюції вірусів та бактерій в природі.

Для всіх аналізів використовували спільні проби, лише змінюючи бактерію-хазяїна. У зв'язку із чим проводили аналіз вищевказаних фагів після зміни хазяїна та пасування зі зміною хазяїна.

Було показано, що всі виділені фаги — 223/4, 7591/1, 7591/2, 7591/3 — після пасажів на штамі *P. syringae pv. tabaci* 223 виявляли стабільну літичну активність на штамі *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013.

Даний факт представляє значний науковий і практичний значення. Такі зміни властивостей фагів зумовлені впливом на дикі типи фагів бактерій-хазяїв, на яких проводили пасажі. Це впливає із наступного:

- на початку аналізу, фаги із рослинних проб не піддавались пасируванню на штаму *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013;

- після їх пасажів на культурах *P. syringae* pv. *tabaci* 223 та *P. syringae* *lachrymans* 7591 фаги почали виявляти та генетично закріпили ознаку здатності до розмноження на штамі *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013.

Очевидно, така властивість фагів диких типів є поширеною в природі. В біоценозі, на відміну від лабораторних умов, фаги взаємодіють з мікробними общинами, які складаються з численних різновидів фагів та чутливих бактерій. Це, очевидно, має вплив на структури екосистем, розмір якого належить оцінити. Еволюційні процеси, які відбуваються в природних екосистемах можуть дозволяють фагам адаптуватись до нових хазяїв.

3.5. Порівняння ефективності посіву фагів на різних штаммах бактеріальних культур

В подальших дослідженнях було проведено порівняння ефективності посіву фагів на різних штаммах бактеріальних культур, визначено титри та ефективність посіву фагів (ЕП) для двох різних бактеріальних культур - *P. syringae* pv. *tabaci* 223 та *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013.

Титр фагу - це кількість фагів у зразку бактерій. У даній таблиці титри фагів вимірюються в бляшкоутворюючих одиницях (БУО) на 1 мілілітр (мл) зразку. Титр фага може бути визначено шляхом серійних розведень зразка з відомим об'ємом, для якого визначається кількість бактеріофагів, або шляхом інших методів, таких як спектрофотометрія. Титр фага є важливим параметром у вивченні взаємодії фагів з бактеріями та їх застосуванні в фаготерапії та інших біотехнологічних застосуваннях.

Ефективність посіву фага (ЕП) - це міра ефективності фага у лізисі бактерій або зупиненні їхнього росту в культурі. Вимірюється відношенням

кількості бактерій, що вижили після обробки фагом, до загальної кількості бактерій у контрольній групі, яка не була оброблена фагом. ЕП може бути визначена відсотковим значенням (%), що відображає частку знищених бактерій, або в інших одиницях виміру, таких як колоніоутворюючі одиниці (КОЕ) або логарифмічна міра зниження кількості бактерій (лог CFU).

Таблиця 3.2 містить результати для чотирьох різних титрів фагів для кожної бактеріальної культури. Для *P. syringae pv. tabaci* 223 титри фагів становлять від $5,28 \times 10^8$ до $7,5 \times 10^8$ БУО/мл, і всі значення ЕП становлять 1. Для *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013 титри фагів становлять від 10^5 до $7,5 \times 10^5$ БУО/мл, а значення ЕП становлять від $1,3 \times 10^{-4}$ до 0,1, що свідчить про значно меншу ефективність посіву фагу для цієї культури бактерій.

В нашому випадку для роботи використовували перехресну адаптацію фагів відповідно: фаги 223/4, 7591/1, 7591/2, 7591/3, після пасування на *P. syringae pv. tabaci* 223 адаптували до *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013. При цьому визначали:

- Титр фагів на *P. syringae pv. tabaci* 223;
- Ефективність посіву на *P. syringae pv. tabaci* 223 приймали за 1;
- Титр фагів, що пройшли пасування на *P. syringae pv. tabaci* 223 на культурі *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013;
- Ефективність посіву фагів, після пасування на *P. syringae pv. tabaci* 223 на культурі *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013;
- Титр фагів після повернення з культури на *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013 на вихідну культуру *P. syringae pv. tabaci* 223;
- Ефективність посіву після повернення на вихідну культуру *P. syringae pv. tabaci* 223.

Таблиця 3.2.

Біологічна активність та ефективність посіву фагів після пасажів на *P. syringae* pv. *tabaci* 223 та *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013

	Титр та ЕП фагів після пасажів на <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 223 та <i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4013							
	223/4		7591/1		7591/2		7591/3	
Бактеріальна культура	Титр фагів, БУО/мл	ЕП	Титр фагів, БУО/мл	ЕП	Титр фагів, БУО/мл	ЕП	Титр фагів, БУО/мл	ЕП
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 223	$7,5 \times 10^7$	1	$7,75 \times 10^6$	1	$5,28 \times 10^8$	1	$7,5 \times 10^8$	1
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4013	$7,5 \times 10^5$	1×10^{-2}	10^5	0,1	10^6	$1,9 \times 10^{-3}$	10^5	$1,3 \times 10^{-4}$

При переході з *P. syringae* pv. *tabaci* 223 на культуру *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013 ефективність посіву різко знижувалась, представлено в табл. 3.2, що свідчить про можливу наявність рестрикційно-модифікаційних бар'єрів у останнього штаму.

Перевірка необоротності змін, набутих при пасуванні на *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, показала, що фаги 223/4 та 7591/2 швидко адаптувались до вихідного хазяїна, відновивши початковий титр. Для фагів 7591/1 та 7591/2 також спостерігається збільшення титру, проте до значень нижчих, за вихідні.

При зміні бактерій-хазяїв дослідження ефективності розмноження фагів показує захисні реакції бактерій та адаптаційні модифікації фагів. Дане дослідження показує розвиток та виживання фагових популяцій у природі: їх адаптації до зовнішнього середовища, фактору хазяїна, генетичного обміну між членами біоценозу.

ВИСНОВКИ

1. Виділено 4 ізолятів бактеріофагів 223/4, 7591/1, 7591/2, 7591/3 зі зразків овочевих культур із симптомами бактеріального ураження.
2. За морфолого-структурною організацією всі ізоляти фагів 223/4, 7591/1, 7591/2, 7591/3 мають ізометричні головки розміром від 60 ± 3 нм до 50 ± 2 нм і короткі хвостові відростки від 15 ± 2 нм до 10 ± 1 нм належать до подовірусів.
3. Виявлено зміну літичної активності зразків при проведенні пасажів на *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013.
4. Встановлено, що титр фагів адаптованих до *P. syringae pv. tabaci* 223 після пасажів на *P. savastanoi pv. phaseolicola* 4013 різко зменшився і практично відновився після повернення до вихідної індикаторної культури *P. syringae pv. tabaci* 223.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sarah D. Williams, Michael J. Boehm, and Francesca Peduto Hand, Department of Plant Pathology.(2017) Bacterial Diseases of Plants. [online]. Available at: <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-gen-6>
2. Michael J. Pelczar. (2021). Pant disease. [online]. Available at: <https://www.britannica.com/science/plant-disease/additional-info#history>
3. Thomson, S. V. (1986). The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology*, 76, pp. 476–482.
4. Bonn, W. G., and van der Zwet, T. (2000). “Distribution and economic importance of fire blight,” in *Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent Erwinia amylovora*, ed. J. L. Vanneste (Wallingford: CAB International), pp. 37.
5. Norelli, J. L., Jones, A. L., and Aldwinckle, H. S. (2003). Fire blight management in the twenty first century using new technologies. *Plant Dis.* 87, pp. 756–765.
6. Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., and Achor, D. S. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol. Plant Pathol.* 5, pp. 1–15.
7. del Campo, R., Russi, P., Mara, P., Mara, H., Peyrou, M., de León, I. P., et al. (2009). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 298, pp. 143–148.
8. Romantschuk, M., Roine, E., and Björklöf, K. (1997). “Attachment of *Pseudomonas syringae* to plant surfaces,” in *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*, Vol. 9, eds K. K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. E. Stead, A. Vivian, and J. von Kietzell (Dordrecht: Springer).
9. Овчаренко Вероника. (2021). Бактеріальний рак. [онлайн]. Доступний за адресою: <https://ogorodniki.com/uk/catalog/bakterialnii-rak>

10. He D-C, J-S Z and Xie L-H. (2016). Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view. *J Integr Agric.*, 15, pp.705–715
11. Buttmer C., McAuliffe O., Ross R. P., Hill C., O'Mahony J., Coffey A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Front. Microbiol.*, 8, pp.34.
12. Sundin GW and Wang N. (2018). Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 56, pp.161–180.
13. La Torre A, Iovino V and Caradonia F. (2018). Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathol Mediterr* 57, pp. 201–236 .
14. Lee J-H, Kim J-H, Kim G-H, Jung J-S, Hur J-S and Koh Y-J. (2005). Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit. *Plant Pathol J.*, 21, pp.119–126.
15. Xu Y, Luo Q-Q and Zhou M-G. (2013). Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLOS ONE*. [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23437082/>
16. Tancos KA and Cox KD. (2016). Exploring diversity and origins of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* isolates in New York through CRISPR spacer arrays. *Plant Dis.*, 100 pp. 1307–1313.
17. Hyun J-W, Kim H-J, Yi P-H, Hwang R-Y and Park E-W. (2012). Mode of action of streptomycin resistance in the citrus canker pathogen (*Xanthomonas smithii* subsp. *citri*) in Jeju Island. *Plant Pathol J.*, 28, pp. 207–211
18. Loc-Carrillo C and Abedon ST. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.*, 1, pp. 111–114.
19. Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST and Sullivan MB. (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J.* 11, pp.1511–1520.

20. Taylor VL, Fitzpatrick AD, Islam Z and Maxwell KL. (2019). The Diverse Impacts of Phage Morons on Bacterial Fitness and Virulence. *Advances in Virus Research*. 103, pp.1–31.
21. Chan BK, Abedon ST and Loc-Carrillo C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.*, 8, pp.769–783.
22. van Houte S, Buckling A and Westra ER. (2016). Evolutionary ecology of prokaryotic immune mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 80, pp.745–763.
23. Fujiwara A., Fujisawa M., Hamasaki R., Kawasaki T., Fujie M., Yamada T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, pp. 4155–4162.
24. Le Roy E. J. (1989). 4828999 Bacteriophage prevention and control of harmful plant bacteria. *Biotechnology Advances*, 7(3), pp. 458.
25. Flaherty J. E., Jones J. B., Harbaugh B. K., Somodi G. C., Jackson L. E. (2000). Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *HortScience.*, 35, pp. 882–884.
26. Flaherty J. E., Harbaugh B. K., Jones J. B., Somodi G. C., Jackson L. E. (2001). H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *HortScience.*, 36, pp. 98–100.
27. Obradovic A., Jones J. B., Momol M. T., Olson S. M., Jackson L. E., Balogh B., Guven K., Iriarte F. B. (2005). Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Dis.*, 89, pp.712–716.
28. Lang J. M., Gent D. H., Schwartz H. F. (2007). Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Dis.*, 91, pp.871–878.
29. Gašić, K., Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Šević, M., & Obradović, A. (2018). Complete Genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* Specific

- Bacteriophage KΦ1, Its Survival and Potential in Control of Pepper Bacterial Spot. *Frontiers in Microbiology*., 9.
30. Gill, J. and Abedon, S. T. (2003). Bacteriophage ecology and plants. *APSnet Features*. [online]. Available at: <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2003-1103>.
 31. Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P. and Jackson, L. E. (2003). Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Dis*. [online]. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.949>
 32. Civerolo E. L., Keil H. L. (1969) Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*., 59, pp.1966–1967.
 33. Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M. and Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* [online]. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.02118-06>
 34. Tewfike, T. A. and Desoky, S. M. (2015). Biocontrol of *Xanthomonas axonopodis* causing bacterial spot by application of formulated phage. *Ann. Agric.Sci.Moshtohor*. [online]. Available at: <https://doi.org/10.21608/assjm.2015.109939>
 35. Arthurs, S. P., Lacey, L. A. and Behle, R. W. (2006). Evaluation of spray-dried lignin-based formulations and adjuvants as solar protectants for the granulovirus of the codling moth, *Cydia pomonella* (L). *J. Invertebr. Pathol.* [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.008>
 36. Balogh, B. (2002). Strategies for improving the efficacy of bacteriophages for controlling bacterial spot of tomato. M.S. thesis. University of Florida, Gainesville, FL, USA.

- 37.Behle, R. W., McGuire, M. R. and Shasha, B. S. (1996). Extending the residual toxicity of *Bacillus thuringiensis* with caseinbased formulations. *J. Econ. Entomol.* [online]. Available at: <https://doi.org/10.1093/jee/89.6.1399>
- 38.Ignoffo, C. M., Garcia, C. and Saathoff, S. G. (1997). Sunlight stability and rain-fastness of formulations of *Baculovirus heliothis*. *Environ. Entomol.* [online]. Available at: <https://doi.org/10.1093/ee/26.6.1470>
- 39.Balogh, B. (2006). Characterization and use of bacteriophages associated with citrus bacterial pathogens for disease control. Ph.D. thesis. University of Florida, Gainesville, FL, USA.
- 40.Boule, J., Sholberg, P. L., Lehman, S. M., O'gorman, D. T. and Svircev, A. M. (2011). Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. [online]. Available at: <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.588250>
- 41.Tanaka, H., Negishi, H. and Maeda, H. (1990). Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* [online]. Available at: <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.56.243>
- 42.Bae, J. Y., Wu, J., Lee, H. J., Jo, E. J., Murugaiyan, S., Chung, E. and Lee, S.-W. (2012). Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt of tomato. *J. Microbiol. Biotechnol.* [online]. Available at: <https://doi.org/10.4014/jmb.1208.08072>
- 43.Bhunchoth, A., Phironrit, N., Leksomboon, C., Chatchawankanphanich, O., Kotera, S., Narulita, E., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T. (2015). Isolation of *Ralstonia solanacearum* infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. *J. Appl. Microbiol.* [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/jam.12763>

44. Rombouts, S., Volckaert, A., Venneman, S., Declercq, B., Vandenheuvel, D., Allonsius, C. N., Van Malderghem, C., Jang, H. B., Briers, Y., Noben, J. P., Klumpp, J., Van Vaerenbergh, J., Maes, M. and Lavigne, R. (2016). Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. *Front. Microbiol.*, 7, pp. 279.
45. Ahmad A. A., Askora A., Kawasaki T., Fujie M., Yamada T. (2014). The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causative agent of citrus canker disease. *Front. Microbiol.*, 5, pp.321.
46. OmniLytics (2006). *OmniLytics Receives OMRI Listing for AgriPhage | OmniLytics | News.* [online]. Available at: <http://www.ns.omnilytics.com/news/news015.html>.
47. Enviroinvest (n.d.). *Business Activity.* [online]. Available at: <http://biotechnologia.enviroinvest.hu/business-activity.html> (accessed March 24, 2016).
48. APS Biocontrol Ltd (n.d.). *APS Biocontrol.* [online]. Available at: <http://apsbiocontrol.com/> (accessed March 24, 2016).
49. Branston. (2012). *A Natural Solution to Takle Potential Soft Rot | Branston Limited.* [online]. Available at: <http://www.branston.com/news/a-natural-solution-to-takle-potential-soft-rot/> (accessed March 24, 2016).
50. OmniLytics (2004). *AgriPhage Product Overview | OmniLytics.* [online]. Available at: http://www.ns.omnilytics.com/products/agriphage/agriphage_info/agriphage_overview.html
51. Doffkay, Z., Dömötör, D., Kovács, T., and Rákhely, G. (2015). Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens. *Acta Biol. Szeged.* 59, 291–302.

52. Farooq U., Yang Q., Ullah M. W., Wang S. (2018). Bacterial biosensing: recent advances in phage-based bioassays and biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 118? pp.204–216.
53. Abedon, S. T., and Yin, J. (2009). Bacteriophage plaques: theory and analysis. *Methods Mol. Biol.*, 501, pp.161–174.
54. Mohammadali Khan Mirzaei and Anders S. Nilsson*. (2015). Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356574/>
55. О.М. Андрійчук., Т.П. Шевченко., А.В. Харіна., В.П. Поліщук. (2011). Методичні рекомендації до спецпрактикуму «Віруси мікроорганізмів» для студентів денної форми навчання ННЦ «Інститут біології». 16-18 с.
56. Goldsmith, C. S., and Miller, S. E. (2009). Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, pp.552–563.
57. Toth IK, Bell KS, Holeva MC, Birch PR. (2003). Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol Plant Pathol.* 4, pp. 17–30.
58. "Viral Zone". (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/141.html) ExPASy. Retrieved 1 July 2015.
59. Kering, Kelvin K., et al. "Application of adaptive evolution to improve the stability of bacteriophages during storage." *Viruses* 12.4 (2020): 423. <https://doi.org/10.3390/v12040423>
60. Jończyk-Matysiak, Ewa, et al. "Factors determining phage stability/activity: Challenges in practical phage application." *Expert Review of Anti-infective Therapy* 17.8 (2019): 583–606. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1646126>
61. Balogh B, Jones JB, Iriarte FB, Momol MT Phage therapy for plant disease control *Curr Pharm Biotechnol*, 11 (1) (2010), pp. 48-57 10.2174/138920110790725302

- 62.Zhang, Yajie, et al. "Manufacturing and ambient stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations." *International journal of pharmaceutics* 542.1–2 (2018): 1–7
- 63.Leung, Sharon SY, et al. "Effect of storage temperature on the stability of spray dried bacteriophage powders." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 127 (2018): 213–222
- 64.Chang, Rachel Yoon Kyung, et al. "Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions." *International journal of pharmaceutics* 560 (2019): 11–18
- 65.Sorour, H.K.; Gaber, A.F.; Hosny, R.A. Evaluation of the Efficiency of Using *Salmonella* Kentucky and *Escherichia Coli* O119 Bacteriophages in the Treatment and Prevention of Salmonellosis and Colibacillosis in Broiler Chickens. *Lett. Appl. Microbiol.* **2020**, *71*, 345–350. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 66.Fong, S.A.; Drilling, A.J.; Ooi, M.L.; Paramasivan, S.; Finnie, J.W.; Morales, S.; Psaltis, A.J.; Vreugde, S.; Wormald, P.-J. Safety and Efficacy of a Bacteriophage Cocktail in an in Vivo Model of *Pseudomonas Aeruginosa* Sinusitis. *Transl. Res.* **2019**, *206*, 41–56. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 67.Iwano, H.; Inoue, Y.; Takasago, T.; Kobayashi, H.; Furusawa, T.; Taniguchi, K.; Fujiki, J.; Yokota, H.; Usui, M.; Tanji, Y.; et al. Bacteriophage ΦSA012 Has a Broad Host Range against *Staphylococcus Aureus* and Effective Lytic Capacity in a Mouse Mastitis Model. *Biology* **2018**, *7*, 8. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
- 68.Ngassam-Tchamba, C.; Duprez, J.N.; Fergestad, M.; De Visscher, A.; L’Abee-Lund, T.; De Vlieghe, S.; Wasteson, Y.; Touzain, F.; Blanchard, Y.; Lavigne,

- R.; et al. In Vitro and in Vivo Assessment of Phage Therapy against *Staphylococcus Aureus* Causing Bovine Mastitis. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2020**, *22*, 762–770. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
69. Geng, H.; Zou, W.; Zhang, M.; Xu, L.; Liu, F.; Li, X.; Wang, L.; Xu, Y. Evaluation of Phage Therapy in the Treatment of *Staphylococcus Aureus*-Induced Mastitis in Mice. *Folia Microbiol.* **2020**, *65*, 339–351. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Gill, J.J.; Pacan, J.C.; Carson, M.E.; Leslie, K.E.; Griffiths, M.W.; Sabour, P.M. Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical *Staphylococcus Aureus* Mastitis in Lactating Dairy Cattle. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2912–2918. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Green Version](#)]
71. Gill, J.J.; Sabour, P.M.; Leslie, K.E.; Griffiths, M.W. Bovine Whey Proteins Inhibit the Interaction of *Staphylococcus Aureus* and Bacteriophage K. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101*, 377–386. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Wang, L.; Qu, K.; Li, X.; Cao, Z.; Wang, X.; Li, Z.; Song, Y.; Xu, Y. Use of Bacteriophages to Control *Escherichia Coli* O157:H7 in Domestic Ruminants, Meat Products, and Fruits and Vegetables. *Foodborne Pathog. Dis.* **2017**, *14*, 483–493. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
73. Stanford, K.; McAllister, T.A.; Niu, Y.D.; Stephens, T.P.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Johnson, R.P. Oral Delivery Systems for Encapsulated Bacteriophages Targeted at *Escherichia Coli* O157:H7 in Feedlot Cattle. *J. Food Prot.* **2010**, *73*, 1304–1312. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Rozema, E.A.; Stephens, T.P.; Bach, S.J.; Okine, E.K.; Johnson, R.P.; Stanford, K.; McAllister, T.A. Oral and Rectal Administration of Bacteriophages for

- Control of *Escherichia Coli* O157:H7 in Feedlot Cattle. *J. Food Prot.* **2009**, 72, 241–250. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 75.Rivas, L.; Coffey, B.; McAuliffe, O.; McDonnell, M.J.; Burgess, C.M.; Coffey, A.; Ross, R.P.; Duffy, G. In Vivo and Ex Vivo Evaluations of Bacteriophages E11/2 and E4/1c for Use in the Control of *Escherichia Coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 7210–7216. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
- 76.Bach, S.J.; McAllister, T.A.; Veira, D.M.; Gannon, V.P.J.; Holley, R.A. Effect of Bacteriophage DC22 on *Escherichia Coli* O157:H7 in an Artificial Rumen System (Rusitec) and Inoculated Sheep. *Anim. Res.* **2003**, 52, 89–101. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- 77.Sheng, H.; Knecht, H.J.; Kudva, I.T.; Hovde, C.J. Application of Bacteriophages to Control Intestinal *Escherichia Coli* O157:H7 Levels in Ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 5359–5366. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Green Version](#)]
- 78.Raya, R.R.; Oot, R.A.; Moore-Maley, B.; Wieland, S.; Callaway, T.R.; Kutter, E.M.; Brabban, A.D. Naturally Resident and Exogenously Applied T4-like and T5-like Bacteriophages Can Reduce *Escherichia Coli* O157:H7 Levels in Sheep Guts. *Bacteriophage* **2011**, 1, 15–24. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
- 79.Callaway, T.R.; Edrington, T.S.; Brabban, A.D.; Anderson, R.C.; Rossman, M.L.; Engler, M.J.; Carr, M.A.; Genovese, K.J.; Keen, J.E.; Looper, M.L.; et al. Bacteriophage Isolated from Feedlot Cattle Can Reduce *Escherichia Coli* O157:H7 Populations in Ruminant Gastrointestinal Tracts. *Foodborne Pathog. Dis.* **2008**, 5, 183–191. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]

80. Verstaappen, K.M.; Tulinski, P.; Duim, B.; Fluit, A.C.; Carney, J.; van Nes, A.; Wagenaar, J.A. The Effectiveness of Bacteriophages against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* ST398 Nasal Colonization in Pigs. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160242. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
81. Kim, K.H.; Ingale, S.L.; Kim, J.S.; Lee, S.H.; Lee, J.H.; Kwon, I.K.; Chae, B.J. Bacteriophage and Probiotics Both Enhance the Performance of Growing Pigs but Bacteriophage Are More Effective. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2014**, *196*, 88–95. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
82. Yan, W.; Banerjee, P.; Liu, Y.; Mi, Z.; Bai, C.; Hu, H.; To, K.W.K.; Duong, H.T.T.; Sy Leung, S. Development of Thermosensitive Hydrogel Wound Dressing Containing *Acinetobacter Baumannii* Phage against Wound Infections. *Int. J. Pharm.* **2021**, 120508. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
83. Thanki, A.M.; Brown, N.; Millard, A.D.; Clokie, M.R.J. Genomic Characterization of Jumbo *Salmonella* Phages That Effectively Target United Kingdom Pig-Associated *Salmonella* Serotypes. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1491. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
84. Tsourkas, P.K. *Paenibacillus* Larvae Bacteriophages: Obscure Past, Promising Future. *Microb. Genom.* **2020**, *6*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
85. Jia, K.; Yang, N.; Zhang, X.; Cai, R.; Zhang, Y.; Tian, J.; Raza, S.H.A.; Kang, Y.; Qian, A.; Li, Y.; et al. Genomic, Morphological and Functional Characterization of Virulent Bacteriophage IME-JL8 Targeting *Citrobacter Freundii*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 585261. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Nikapitiya, C. Isolation and Characterization of Phage (ETP-1) Specific to Multidrug Resistant Pathogenic *Edwardsiella Tarda* and Its in Vivo Biocontrol

- Efficacy in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Biologicals* **2020**, 63, 14–23. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
87. Khairnar, K.; Raut, M.P.; Chandekar, R.H.; Sanmukh, S.G.; Paunikar, W.N. Novel Bacteriophage Therapy for Controlling Metallo-Beta-Lactamase Producing *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Catfish. *BMC Vet. Res.* **2013**, 9, 264. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Green Version](#)]
88. Hoang, A.H.; Tran, T.T.X.; Le, P.N.; Dang, T.H.O. Selection of Phages to Control *Aeromonas Hydrophila*—An Infectious Agent in Striped Catfish. *Biocontrol Sci.* **2019**, 24, 23–28. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Green Version](#)]
89. Le, T.S.; Southgate, P.C.; O'Connor, W.; Vu, S.V.; Kurtböke, D.İ. Application of Bacteriophages to Control *Vibrio Alginolyticus* Contamination in Oyster (*Saccostrea Glomerata*) Larvae. *Antibiotics* **2020**, 9, 415. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
90. Le, T.S.; Southgate, P.C.; O'Connor, W.; Abramov, T.; Shelley, D.; Vu, S.V.; Kurtböke, D.İ. Use of Bacteriophages to Control *Vibrio* Contamination of Microalgae Used as a Food Source for Oyster Larvae during Hatchery Culture. *Curr. Microbiol.* **2020**, 77, 1811–1820. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
91. Srinivasan, R.; Chaitanyakumar, A.; Subramanian, P.; Mageswari, A.; Gomathi, A.; Aswini, V.; Sankar, A.M.; Ramya, M.; Gothandam, K.M. Recombinant Engineered Phage-Derived Enzybiotic in *Pichia Pastoris* X-33 as Whole Cell Biocatalyst for Effective Biocontrol of *Vibrio Parahaemolyticus* in Aquaculture. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 154, 1576–1585. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
92. Silva, Y.J.; Costa, L.; Pereira, C.; Mateus, C.; Cunha, Â.; Calado, R.; Gomes, N.C.M.; Pardo, M.A.; Hernandez, I.; Almeida, A. Phage Therapy as an

- Approach to Prevent *Vibrio Anguillarum* Infections in Fish Larvae Production. *PLoS ONE* **2014**, 9, e114197. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
93. Richards, G.P.; Watson, M.A.; Madison, D.; Soffer, N.; Needleman, D.S.; Soroka, D.S.; Uknalis, J.; Baranzoni, G.M.; Church, K.M.; Polson, S.W.; et al. Bacteriophages against *Vibrio Coralliilyticus* and *Vibrio Tubiashii*: Isolation, Characterization and Remediation of Larval Oyster Mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
94. Tuson, H.H.; Weibel, D.B. Bacteria–Surface Interactions. *Soft Matter* **2013**, 9, 4368. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Green Version](#)]
95. Fryer, P.J.; Asteriadou, K. A Prototype Cleaning Map: A Classification of Industrial Cleaning Processes. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, 20, 255–262. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
96. Busscher, H.J.; Norde, W.; van der Mei, H.C. Specific Molecular Recognition and Nonspecific Contributions to Bacterial Interaction Forces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 74, 2559–2564. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
97. Jain, S.; Chen, J. Attachment and Biofilm Formation by Various Serotypes of Salmonella as Influenced by Cellulose Production and Thin Aggregative Fimbriae Biosynthesis. *J. Food Prot.* **2007**, 70, 2473–2479. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Islam, M.S.; Zhou, Y.; Liang, L.; Nime, I.; Liu, K.; Yan, T.; Wang, X.; Li, J. Application of a Phage Cocktail for Control of Salmonella in Foods and Reducing Biofilms. *Viruses* **2019**, 11, 841. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[Green Version](#)]
99. Sadekuzzaman, M.; Mizan, M.F.R.; Yang, S.; Kim, H.-S.; Ha, S.-D. Application of Bacteriophages for the Inactivation of Salmonella Spp. in Biofilms. *Food Sci. Technol. Int.* **2018**, 24, 424–433. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

100. Gong, C.; Jiang, X.; Wang, J. Application of Bacteriophages to Reduce Salmonella Contamination on Workers' Boots in Rendering-Processing Environment. *Poult. Sci.* 2017, 96, 3700–3708. [Google Scholar] [CrossRef]
101. Zhang, Y.; Hu, Z. Combined Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms with Bacteriophages and Chlorine. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110, 286–295. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
102. Møretør, T.; Langsrud, S. Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality: Residential Bacteria in Food Industry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2017, 16, 1022–1041. [Google Scholar] [CrossRef] [Green Version]
103. Magin, V.; Garrec, N.; Andrés, Y. Selection of Bacteriophages to Control in Vitro 24 h Old Biofilm of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Drinking and Thermal Water. *Viruses* 2019, 11, 749. [Google Scholar] [CrossRef] [Green Version]
104. Mukherjee, A.K.; Bhagowati, P.; Biswa, B.B.; Chanda, A.; Kalita, B. A Comparative Intracellular Proteomic Profiling of *Pseudomonas Aeruginosa* Strain ASP-53 Grown on Pyrene or Glucose as Sole Source of Carbon and Identification of Some Key Enzymes of Pyrene Biodegradation Pathway. *J. Proteom.* 2017, 167, 25–35. [Google Scholar] [CrossRef]
105. Lee, E.-H.; Cho, K.-S. Characterization of Cyclohexane and Hexane Degradation by *Rhodococcus* Sp. EC1. *Chemosphere* 2008, 71, 1738–1744. [Google Scholar] [CrossRef]
106. Tremblay, J.; Yergeau, E.; Fortin, N.; Cobanli, S.; Elias, M.; King, T.L.; Lee, K.; Greer, C.W. Chemical Dispersants Enhance the Activity of Oil- and Gas Condensate-Degrading Marine Bacteria. *ISME J.* 2017, 11, 2793–2808. [Google Scholar] [CrossRef] [Green Version]
107. Pomeroy, L.R.; Williams, P.J.I.B.; Azam, F.; Hobbie, J.E. The Microbial Loop. *Oceanography* 2007, 20, 28–33. [Google Scholar] [CrossRef]

108. Rosenberg, E.; Bittan-Banin, G.; Sharon, G.; Shon, A.; Hershko, G.; Levy, I.; Ron, E.Z. The Phage-Driven Microbial Loop in Petroleum Bioremediation. *Microb. Biotechnol.* 2010, 3, 467–472. [Google Scholar] [CrossRef] [Green Version]
109. Bratbak, G.; Thingstad, F.; Heldal, M. Viruses and the Microbial Loop. *Microb. Ecol.* 1994, 28, 209–221. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed] [Green Version]
110. Khairnar, K.; Chandekar, R.; Nair, A.; Pal, P.; Paunikar, W.N. Novel Application of Bacteriophage for Controlling Foaming in Wastewater Treatment Plant- an Eco-Friendly Approach. *Bioengineered* 2016, 7, 46–49. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed] [Green Version]
111. Choi, J.; Kotay, S.M.; Goel, R. Bacteriophage-Based Biocontrol of Biological Sludge Bulking in Wastewater. *Bioeng. Bugs* 2011, 2, 214–217. [Google Scholar] [CrossRef]