КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ “Інститут біології та медицини”
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Будзанівська І.Г.
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____2024 р.

ВЛАСТИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ БАКТЕРІОФАГІВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ *SERRATIA* ТА *PSEUDOMONAS*

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю вірусологія
Науменко Олександри Олегівни

Науковий керівник від кафедри
к.б.н., доц. Андрійчук О.М.

Робота виконана на базі кафедри вірусології
ННЦ “Інститут біології та медицини” КНУ імені Тараса Шевченка
під керівництвом к.б.н. Андрійчук Олени Миколаївни

Оцінка захисту роботи

Київ - 2024 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота;

РНК - рибонуклеїнова кислота;

ПЛР - полімеразно ланцюгова реакція;

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами).

ЗМІСТ

ВСТУП……...…….....4

РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика бактеріофагів, фаготерапії та бактерій 6

1.1. Біологічна характеристика бактеріофагів.....6

1.2. Фаготерапія.....8

1.3. Фітобактерії.....12

1.3.1. Бактерії роду Pseudomonas.....13

РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи.....18

2.1. Джерела бактерій і фагів.....18

2.2. Титрування по Граціа.....19

2.3. Визначення спектру літичної активності фагів.....20

2.4. Препаративне отримання фагів їх очистка та концентрація.....20

2.5. Накопичення бактеріофагів.....21

2.6. Електронна мікроскопія.....22

2.7 Визначення термінів збереження біологічної активності фагів.....22

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень.....24

3.1. Виділення ізолятів фагів із рослин з ознаками бактеріозів.....24

3.2. Спектр літичної активності бактеріофагів.....28

3.3. Електронна мікроскопія.....30

3.4. Проведення методу “Спот-Тест”.....33

3.5. Визначення термінів збереження біологічної активності фагів.....38

ВИСНОВКИ.....45

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....46

ВСТУП

Велика частина економічних збитків у аграрно-промислових галузях світу зумовлена активним розповсюдженням бактеріальних інфекцій. Ступінь цих збитків варіюється в залежності від країни, однак для України наразі дана проблема є актуальною. В структурі українського експорту продовольство та аграрна продукція становить 45% від загальної кількості, що є майже половиною від всієї галузі. Що важливо, велику частину продукції займають зернові культури – пшениця, кукурудза тощо, а також овочі і фрукти, які є природною мішенню патогенних бактерій. При цьому останніми роками спостерігається тенденція до збільшення кількості бактеріальних хвороб, що спричинено як об'єктивними факторами (кліматичні зміни, інтродукція нових культур), так і суб'єктивними (недостатній контроль за збудниками, несвоєчасне виявлення, застосування надмірної кількості пестицидів). Зважаючи на вищеописане, дослідження бактеріальних захворювань безсумнівно потребує більшої уваги та детальнішого вивчення. Одним із варіантів вирішення цієї проблеми вже більше 100 років є терапія зі використанням бактеріофагів.

Вперше про існування бактеріофагів стало відомо Ернесту Ханбері Ханкіну у 1896 році після того як він помітив їх присутність в індійських річках Гангу та Ямуні [1]. Однак можливість їх використання на користь людині була розглянута лише коли, незалежно один від одного, у 1915 та 1917 роках Фредерік Творт та Фелікс д'Ерель наново відкрили віруси, які уражують бактерії. З того часу у науці почався розвиток застосування бактеріофагів у медицині [2]. В більшості випадків фокус досліджень був зосереджений на патогенних для людини бактеріях, однак після 1940-х років, в які відбулось активне заміщення фаготерапії антибіотиками, науковці почали розвивати сферу використання бактеріофагів у різних галузях сільського господарства, в тому числі для фітотерапії [3]. Тому вже у 1924 році дослідники В. Маллман і К. Хемстріт продемонстрували, що фільтрат з гнилої капусти пригнічує

розповсюдження так званого «організму чорної капустяної гнилі» *Xanthomonas campestris pv. campestris*. У 1926 році Мур припустив, що фаги можна використовувати як засоби боротьби з інфікуванням, і незабаром після цього фаги були успішно використані для запобігання гнилі бульб картоплі, спричиненої *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* та як засіб для обробки насіння для зниження частоти в'янення кукурудзи Стюарта, спричиненого *Pantoea stewartii* [4].

Одними з найбільш розповсюджених бактерій, що спричиняють бактеріози є бактерії роду *Pseudomonas*. Наприклад, у *Pseudomonas syringae* відомо понад 60 патоварів, кожен з яких заражає характерну групу рослин-хазяїв. У сукупності патогени *P. syringae* уражують майже всі економічно важливі види сільськогосподарських культур, що робить цей вид бактерій одним з найпоширеніших збудників серед рослин [5]. Спалахи інфекцій, викликані новими ізолятами *P. syringae*, загрожують світовому рослинництву. Для прикладу можна навести *P. syringae pv. Actinidiae*, вид, який уражує плоди ківі, ще з 2008 року спричинює пандемію раку ківі у всьому світі [6].

Таким чином, використання бактеріофагів у фітотерапії бактеріальних захворювань спричинених бактеріями роду *Pseudomonas* та вивчення їх біологічних особливостей має суттєве значення для забезпечення потреб сучасності і у науковій, і у промисловій галузях.

РОЗДІЛ 1
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОФАГІВ, ФАГОТЕРАПІЇ ТА БАКТЕРІЙ

Бактеріофаги - це віруси, які інфікують і розмножуються тільки в бактеріальних клітинах. Вони повсюдно поширені в навколишньому середовищі і визнані найпоширенішим біологічним агентом на землі, а також надзвичайно різноманітні за розміром, морфологією та організацією геному.

1.1. Біологічна характеристика бактеріофагів

Всі бактеріофаги складаються з одно або дволанцюгової нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), укладеної в оболонку з кодованих фагом капсидних білків, які захищають генетичний матеріал і опосередковують його транспорт в наступну клітину-хазяїна. Генетична інформація може зберігатися у вигляді лінійної, або кільцевої структури. Крім капсиду, до їх будови може входити хвостовий відросток. Розміри бактеріофагів варіюють від 20 до 400 нм. Детально оцінити структуру фагів вченим вдалось лише в 1940 році, коли Г. Руска, Пфанкух і Кауше, працюючи в лабораторії Сіменс і Гальске, опублікували дві короткі роботи, подані в один день до журналу, де показали перші електронно-мікроскопічні фотографії бактеріофагів у світовій літературі. Гельмут Руска на фото показав культури бактерій, змішані з суспензією фага, при збільшенні в 14 000 разів. Бактерії були неушкодженими або лізованими, оточені великою кількістю круглих часточок [7].

Розвиток науки дозволяв розвивати знання щодо життєвого циклу вірусів бактерій. Так як всі представники є облігатними внутрішньоклітинними паразитами, для реплікації вони використовують бактеріальну машинерію. У ході досліджень також стало відомо, що після того, як бактеріофаг прикріплюється до клітини-хазяїна, він використовує одну з двох стратегій

реплікації: літичну або лізогенну, що є їх особливістю. Рецептори для адгезії бактеріофага при цьому включають білки зовнішньої мембрани, тейхоєву кислоту, джгутики, пілі, капсули або шари слизу та ліпополісахариди.

Під час циклу літичної реплікації фаг приєднується до чутливої бактерії-хазяїна, вводить свій геном у цитоплазму клітини-хазяїна та використовує рибосоми для продукування вірусних білків. Ресурси клітини-хазяя швидко перетворюються на вірусні геноми та капсидні білки, які збираються у копії дозрілого фага. Коли клітина-хазяїн гине, вона або активно, або пасивно лізується, вивільняючи новий бактеріофаг для інфікування іншої клітини-хазяїна. У циклі лізогенної реплікації фаг також приєднується до чутливої бактерії-хазяїна і вводить його геном у цитоплазму клітини-хазяїна, проте геном фага інтегрується в хромосому бактеріальної клітини або залишається як епісомальний елемент, де в обох випадках він реплікується і передається дочірнім бактеріальним клітинам, не знищуючи їх. Інтегровані геноми фагів називають профагами, а бактерії, що їх містять, називають лізогенами. Профаги можуть повернутися до літичного циклу реплікації та вбити свого господаря, найчастіше так відбувається у відповідь на зміну умов навколишнього середовища [8].

Звісно, зважаючи на певні відмінності в біологічних ознаках, виникла потреба класифікації. Історично, ще до існування полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), секвенування та інших молекулярних методів, фаги класифікувались відповідно до їх морфології. Для фагів, які мали хвостові відростки, таксономія була затверджена з класифікаційної роботи Девіда Бредлі (Меморіальний університет, Канада), який, використовуючи електронну мікроскопію, класифікував їх на три морфотипи: A (скоротливий хвостовий відросток), B (довгий, не скоротливий хвостовий відросток), C (короткий нескоротливий хвостовий відросток). Так, починаючи з 1971 року класифікація бактеріофагів суттєво змінювалось, в тому числі за назвами, і станом на 2020 рік Міжнародний комітет з питань систематики вірусів

затвердив 59 порядків, 189 родин, 2224 родів та 9110 видів бактеріофагів [9, 10].

1.2. Фаготерапія

Окрім перевідкриття бактеріофагів Фелікс д'Ерель також першим запропонував використовувати їх для боротьби з бактеріальними захворюваннями. Існує багато застосувань фаготерапії, включаючи, але не обмежуючись, у сільському господарстві, ветеринарії, океанології та медичних науках. Наразі фаготерапія є широковживаною у всьому світі, а початок її популяризації припав на 1940-ві роки, коли індустрії антибіотиків необхідна була аналогічна прерогатива через велику кількість випадків антибіотикорезистентності [11].

У фаготерапії існує велика кількість переваг. Одними з них є: бактеріофаги можна використовувати як проти бактерій, які піддаються лікуванню, так і проти антибіотикорезистентних видів, до того ж їх можна використовувати як окремо, так і разом з антибіотиками та іншими препаратами. Фаги реплікуються в ході лікування, що збільшує їх концентрацію в організмі, що в результаті може сприяти зменшенню необхідної для лікування дози препаратів. Крім того, дуже важливим показником є їх низька токсичність, у порівнянні з антибіотиками [12]. Зокрема, Schooley [13] зумів знайти ефективний варіант використання фаготерапії для лікування 68-річного чоловіка, який страждав на некротичний панкреатит, ускладнений мультирезистентною інфекцією *Acinetobacter baumannii*. Незважаючи на багаторазове лікування антибіотиками, стан пацієнта з часом швидко погіршувався. Тому виділений від пацієнта штам *A. baumannii* був використаний для скринінгу фагів у двох різних лабораторіях, що дозволило скласти так звані "фагові коктейлі" для пацієнта. Введення фага (через катетери в черевну порожнину, а також внутрішньовенно) швидко

покращувало клінічний стан пацієнта, знищуючи інфекцію. Використання фагових коктейлів є ще одним прогресивним кроком у медичній галузі. Так як одним із недоліків цієї терапії є те, що часто віруси бактерій мають вузьке коло хазяїв, часто підбирання необхідного препарату займало велику кількість часу, або за умови коінфекції пацієнта різними патогенами не давало ефективних результатів. Задля вирішення цього питання почали використовувати фагові коктейлі, які, крім того, що збільшують діапазон мішеней, також запобігають розвитку фагорезистентних бактерій. Постійне використання однакових систем призвело до розвитку багатьох механізмів фагорезистентності в бактеріях, наприклад пригніченню можливості адсорбції фагів, абортивної інфекції, імунної системи CRISPR/Cas та системи рестрикції-модифікації. Використовуючи більше ніж один тип фага, бактерії мішені не розвиватимуть стійкість до всіх фагів одночасно. Фаговий коктейль можна приготувати за поетапним методом, який передбачає виділення фагів з використанням штаму бактерій дикого типу та фагорезистентних мутантів дикого типу. Для виділення першого фага використовують бактеріальний штам дикого типу. Після цього бактерії дикого типу стають нечутливими до першого фагу, що призводить до фагорезистентного мутанта. Потім фагорезистентний мутант використовують для виділення другого фага. Цей процес можна повторити для виділення третього фага з використанням бактеріального мутанта, стійкого до другого фагу. Нарешті, всі фаги об’єднуються в коктейль, який може зменшити розвиток фагорезистентних бактерій. Фагові коктейлі також можна приготувати шляхом ідентифікації різних фагових рецепторів у патогені та вибору фагів, специфічних для цих рецепторів. Окрім цього методу, також можна підбирати коктейлі за методом відбору на основі літичних або лізисних кривих. Фаголітична крива є мірою бактерицидної активності літичних фагів. Літичні криві отримують шляхом безперервного вимірювання оптичної щільності бактерій у експоненційній фазі, інфікованих фагами заданої концентрації протягом певного періоду часу. Фаги, які призводять до значного зниження оптичної щільності бактерій і різних моделей літичної кривої,

відбираються і можуть бути сформульовані у фаговий коктейль з високою літичною активністю. Різні моделі літичної кривої зазвичай означають, що фаги мають різні механізми взаємодії з бактеріями-господарями, отже, бактерії не можуть створювати стійкість до всіх фагів одночасно. Звичайно, все одно необхідний постійний моніторинг патогенів та відповідного перероблення фагових коктейлів [14].

Отже, бактеріофаги часто використовуються для покращення медичної допомоги при бактеріальних захворюваннях у людини, проте не менш розвиненим є їх використання у агропромисловій галузі. Перший продукт на основі бактеріофагів був зареєстрований в Агентстві з охорони навколишнього середовища США в 2005 році компанією OmniLytics Inc., Солт-Лейк-Сіті, Юта, і наразі бактеріофаги є комерційно доступними. З 1990-х років фагова терапія була визнана ефективною для боротьби з низкою широко розповсюджених фітобактерій, включаючи *Xanthomonas spp.* (бактеріальна плямистість помідорів, персиків, герані та цитрусових, фітофторозу цибулі, фітофторозу волоського горіха та раку цитрусових), *Pseudomonas spp*. (бактеріальна плямистість гриба), *Erwinia spp., Ralstonia* (бактеріальне в'янення тютюну) і *Streptomyces* (парша картоплі) [15].

Основні проблеми, пов'язані з використанням фагів у рослинництві, пов'язані з тим, що сільськогосподарське виробництво часто знаходиться у відкритому середовищі. Таким чином, фаги перебувають в системах, де немає контролю над факторами навколишнього середовища, такими як температура, світлове опромінення, рівень вологості або pH. Крім того, у сільськогосподарських умовах фаги повинні забезпечувати тривалий захист сприйнятливих тканин рослин на тижні або місяці, при цьому територіально займати великі площі. Більше того, бактерії часто займають захищені місця, наприклад всередині, або під бруньками, а також в ґрунтових прошарках, де вони недоступні для фагів. Враховуючи ці проблеми, можна стверджувати, що фагова терапія має більший потенціал у системах, де середовище закрите і контрольоване, термін найбільшої вразливості рослин короткий, бактерія-

мішень становить більшість присутньої популяції і ця популяція легкодоступна для вірусів [15]. Окрім того, без діагностики визначити природу симптомів складно, адже ознаками захворювань у рослин є в’янення, плямистість (некроз), цвіль, пустули, гниль, гіпертрофія та гіперплазія (розростання), деформація, зміна кольору та руйнування ураженої тканини, і всі ці симптоми не обов’язково викликаються бактеріями. В'янення виникає внаслідок втрати тургорного тиску в клітинах і тканинах. Це викликано як абіотичними, так і біотичними факторами. Плямистість пов’язана здебільшого з частковою загибеллю тканин рослин внаслідок біотичних факторів. Пліснява та гниття виникають в результаті ураження рослини грибком. Гниль призводить як до загибелі внутрішньоклітинного вмісту (бактеріальна волога або грибкова суха гниль), так і до руйнування міжклітинної речовини та клітинної оболонки (грибкова суха гниль). Гіпертрофія і гіперплазія представляють надмірне зростання і проліферацію ураженої тканини, викликане патогенами. Деформації (зморшкуватість, скручування і згортання; ниткоподібне листя, потворність плодів, двоквітність) можуть бути викликані різними біотичними та абіотичними факторами через відтік продуктів фотосинтезу, нерівномірне надходження рослиною поживних речовин або нерівномірність зростання різних тканинних елементів. При муміфікації органи рослин пошкоджуються міцелієм грибів, що призводить до зморщування, потемніння або ущільнення рослин. Зміни кольору зазвичай відбуваються через дисфункцію хлоропластів і низький вміст хлорофілу в листках, що проявляється у світлій забарвленні деяких ділянок листя (мозаїчне знебарвлення) або всього листа (хлороз). Проте діагностика часто потребує багато ресурсів, включаючи фінансові, що може затримати процес і пришвидшити розвиток інфекції, в тому числі бактеріальної. При цьому, через підвищення середньорічної температури є підстави вважати, що економічні втрати від бактеріальних хвороб будуть тільки зростати в найближчі роки. При щорічному підвищенні середньодобової температури влітку на 3–4°C

поширеність бактеріальних захворювань зростає вдвічі, а поширеність зараження рослин – на 30–50% [16].

1.3. Фітобактерії

Бактерії зустрічаються повсюдно і можуть бути патогенними для тварин, рослин і грибів. Генетична інформація бактерій закодована в ДНК у вигляді хромосоми; в клітині можна знайти більше однієї хромосоми. Бактеріальна клітина може містити позахромосомні мобільні генетичні елементи: плазміди, які можуть нести важливі фактори вірулентності або, навпаки, біологічні фактори контролю. Бактерії також можуть містити профаг, який являє собою ДНК бактеріофага, інтегровану в геном. Більшість бактерій поділяються шляхом подвійного поділу, як правило, з одночасним дублюванням як хромосомної ДНК, так і позахромосомних елементів. Вони також мають клітинну мембрану, яка відокремлює цитоплазму від зовнішнього середовища. Залежно від будови клітинної стінки бактерії поділяють на грампозитивні та грамнегативні. Клітинна стінка грампозитивних бактерій складається з мембрани і товстого пептидогліканового шару. Основним компонентом останнього є багатошаровий муреїн. Пептидоглікан також містить білки, ліпіди, а також тейхоєву та тейхуронову кислоти. Клітинна стінка грамнегативних бактерій має дві мембрани з пептидоглікановим шаром між ними. Зовнішня мембрана містить ліпополісахариди та порини, але не містить тейхоєвої та ліпотейхоєвої кислоти.

Через наявність клітинної стінки бактеріям потрібні системи секреції, які відіграють одну з ключових ролей у ступені вірулентності фітобактерій. Ці системи необхідні для викачування ксенобіотиків, а також вивільнення різних білків і факторів вірулентності та поділяються на кілька груп за своєю будовою. Існує щонайменше шість різних типів секреційних систем, типових для грамнегативних бактерій, чотири типи, що виявляються у грампозитивних

бактерій, і два типи, присутні в обох групах. Як правило, фітопатогенні бактерії розмножуються повільніше, ніж непатогенні, і мають температурний оптимум 20–30°C [17].

Фітоплазми і спіроплазми — це дві групи дуже дрібних (близько 1 мкм в діаметрі) бактерій без клітинної стінки (вони відокремлені від зовнішнього середовища цитоплазматичною мембраною). Вони викликають фітоплазмоз і затримку росту. Фітоплазмоз значно знижує як кількість врожаю, так і його якість. Втрати сягають 40% для баклажанів, 60% для томатів, 93% для перцю, 30–80% для картоплі, та 100% для огірків. Для рослин з фітоплазмозом характерні такі порушення генеративних органів, як віресценція (позеленіння квіток і втрата нормальної пігментації), філодія (перетворення частини квітки в листоподібне утворення), проліферація (поява кількох «псевдо» квіток). замість одного). Крім того, фітоплазмоз може призвести до симптому відьминого віника (підвищена кущистість), карликовості та в'янення рослин, а також деформації листя. Відомий лише один випадок захворювання, який призводить до економічно корисного ефекту: це фітоплазмоз пуансетії, популярної сезонної декоративної рослини [18].

1.3.1. **Бактерії роду Pseudomonas**

Рід *Pseudomonas* є дуже різноманітним і поширеним серед усіх країн світу, наразі він включає 272 види, виділені з багатьох різних середовищ, таких як ґрунт, вода та повітря, а також має широке коло хазяїв: тварини, рослини, гриби, і водорості. Крім того, багато з цих видів, або штамів, є дуже важливими патогенами людини, тварин або рослин. Таке поширення та стійкість до несхожих умов є результатом високої геномної складності та пластичності цих бактерій. Наприклад, порівняння 389 штамів *P. aeruginosa* показало, що разом лише 17,5% їхніх геномів є спільними. Ця «основна» частина геному залишає місце для великої «допоміжної» частини, яка здатна до швидких мутаційних

процесів під час нішевої адаптації як в екологічних, так і в патогенних ізолятах. Ця геномна універсальність також дозволяє кодувати та продукувати широкий спектр клітинно-асоційованих та позаклітинних факторів вірулентності, що робить бактерії цього роду добре адаптованими до навколишнього середовища.

Особливу увагу приділяють вивченню *Pseudomonas aeruginosa,* синьогнійної палички, так як ця бактерія хоч і є умовно-патогенноюдля мікроорганізму людини, проте стійкою до багатьох антибіотиків. Цей вид є основною причиною багатьох інфекцій і часто вражає пацієнтів з ослабленим імунітетом [19]. Складні мікробні спільноти також існують в ряді овочів і фруктів, окрім, наприклад, молока та м'ясних продуктів, і ендофітні та зовнішні паразити *P. aeruginosa* зазвичай виділяються у свіжих сирих овочах і фруктах, наприклад, огірках, помідорах, цибулі, моркві, салаті, шпинаті, селері тощо. *Pseudomonas spp.* (23%) був домінуючим мікробним агентом, знайденим як у зразках м'якої гнилі, так і в цілих зразках салату (n = 100) у Нігерії. Наприклад, у дослідженні, Ezemba, C. та ін. (2022) виявив, що в салаті та чотирьох інших готових до вживання зразках на кампусі Улі ймовірність ідентифікації *E.coli, Klebsiella pneumoniae* та *P. aeruginosa* становила 68,45%, 20,24% та 11,31% відповідно . Сирі та свіжі овочеві культури діють як вектор, який передає умовно-патогенну *P. aeruginosa* людям, у тому числі людям з ослабленим імунітетом. Імунокомпетентні люди, як і пацієнти з кістозним фіброзом, особливо вразливі до гострих або хронічних легеневих інфекцій, спричинених *P. aeruginosa*. [20]. Інший еволюційно близький вид, *Pseudomonas stutzeri*, широко поширений в навколишньому середовищі і багато використовувався як модельний об'єкт для досліджень денітрифікації, деградації забруднюючих речовин, взаємодії з токсичними металами, а останнім часом, в клінічних умовах, як умовний патоген людини. *Pseudomonas syringae* — один із найпоширеніших і, відповідно, добре вивчених збудників рослин, що вражає філосферу і живе на поверхнях рослин як епіфіт. Іншою помітною групою в межах роду є *Pseudomonas fluorescens*; який розглядається

не як окремий вид, аяк «видовий комплекс», або ж більш широка філогенетична група, яка включає щонайменше 52 види. Хоча різні штами *P. fluorescens*, як правило, вважаються ґрунтовими та ризосферними бактеріями, деякі також беруть участь у індукуванні інфекцій людини. *Pseudomonas chlororaphis* досліджують на предмет його властивостей, що стимулюють ріст рослин, і особливо на вироблення вторинних метаболітів, які захищають рослину від грибів, нематод і комах. *Pseudomonas putida* — це ґрунтова бактерія, яка здатна руйнувати багато органічних сполук (включаючи ксенобіотики) і, таким чином, була широко вивчена для використання в біоремедіації.

Протягом багатьох років морфологічні та фенотипові характеристики використовувалися для ідентифікації та диференціації різних видів цього роду. Бактерії, які були грамнегативними, суворо аеробними та не утворювали спор, а також виглядали як рухливі бацили, були класифіковані як рід *Pseudomonas*. Однак нові технології методів, які досліджують нуклеїнові кислоти, кінця 20-го століття (особливо використання послідовностей 16S рибосомної РНК (рРНК) від Карла Везе) дозволили розробити більш уточнену класифікацію в межах гамма-протеобактерій. Такі дослідження 16S рРНК допомогли ідентифікувати види, які були неправильно віднесені до роду *Pseudomonas*, коли класифікація була заснована виключно на фенотипових/біохімічних ознаках [19].

Велика кількість наукових досліджень, які пов’язані з дослідженням фітобактерій роду *Pseudomonas* присвячені *P. syringae.* Враховуючи, що переважна більшість штамів *P. syringae* мають подібний розмір геному приблизно 5–6 Мб, можна очікувати приблизно однакову кількість мутацій (на клітину на покоління) у всіх лініях. Ніщо не свідчить про те, що це припущення є невірним; однак слід також зазначити, що на швидкість мутації може істотно впливати фактор навколишнього середовища. Залежно як від екології, так і від виражених фенотипів, деякі штами можуть бути більш чутливими до змін у частоті мутацій, опосередкованих навколишнім

середовищем, ніж інші. Наприклад, добре відомо, що штами різняться за рівнем флуоресценції та пігменту, які здатні діяти як захист від ультрафіолету. Аналогічно, додаткові гени відновлення ДНК, знайдені на деяких плазмідах *P. syringae*, можуть знизити швидкість мутації клітини-хазяїна. Одним із феноменів, якому приділено відносно мало уваги в літературі з патології рослин, є наявність штамів гіпермутаторів. Штами-гіпермутатори мають дефекти в системах репарації ДНК, що призводить до збільшення частоти спонтанних мутацій. Хоча ці штами мають підвищене мутаційне навантаження, що може знизити чисту пристосованість лінії, вони також мають більше шансів спонтанно генерувати корисні їм мутації, які покращують їх вірулентність та адаптацію до певного середовища. Застосування нових методів у геномній епідеміології, а також детальніше вивчення фітобактерій цього і інших видів роду *Pseudomonas* сприятиме розумінню того, як штами пристосовуються до конкретних культур, конкурують з уже існуючими клональними лініями та поширюються у світі [20]. Для лікування інфекцій, викликаних P. aeruginosa, часто використовують вісім категорій антимікробних засобів: аміноглікозиди (гентаміцин, амікацин, нетилміцин, тобраміцин), карбапенеми (іміпенем, меропенем, дорипенем), цефалоспорини (цефтазидим, цефепім), фторхінолони (ципрофлоксацин, левофлоксацин), пеніциліни з інгібіторами β-лактамаз (тикарцилін-клавуланова кислота, піперацилін-тазобактам), монобактамами (азтреонам), фосфоновими кислотами (фосфоміцин) і поліміксинами (колістин і поліміксин B). Цефтазидим-авібактам і цефтолозан-тазобактам вже схвалені управліннями з продовольства та медикаментів в США та інших країнах та доступні для використання, тоді як цефідерокол та іміпенем-циластатин/релебактам наразі знаходяться на стадії розроблення та тестування [21]. P. aeruginosa має неклональну епідемічну структуру популяції, розділену певними типами послідовностей. Популяційна структура цієї бактерії схожа на популяційну структуру Neisseria meningitidis, поверхневого клонального представника з високою частотою рекомбінації, в якій зазвичай виникають

рідкісні високопатогенні епідемічні лінії. Схоже, існує консенсус щодо того, що клінічні і екологічні ізоляти не відрізняються один від одного і що немає жодного зв’язку між даним клоном і конкретним середовищем проживання. Однак лікарняна передача може збільшити поширеність особливо адаптованих клонів. Деякі типи послідовностей поширені по всьому світу і часто пов’язані зі спалахами та розповсюдженням карбапенемаз. Карбапенемази є β-лактамазами з різною гідролітичною здатністю. Вони мають здатність гідролізувати пеніциліни, цефалоспорини, монобактами, карбапенеми. Бактерії, що продукують ці β-лактамази, можуть спричинити серйозні інфекції, при яких карбапенемазна активність робить багато β-лактамів неефективними [22]. Основними прикладами таких небезпечних бактеріальних ліній є ST235, ST111 і ST175 у P. aeruginosa [23].

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Джерела бактерій і фагів

В роботі використовували індикаторні культури фітопатогенних бактерій, що були надані для роботи з колекції музею інституту мікробіології і вірусології Д.К. Заболотного НАН України, (штами: *P. syringae pv. tabaci 223, P. syringae pv. tabaci 8646, P. syringae pv. phaseolicola 4228, P. syringae pv. phaseolicola 4013, P. syringae pv. cerasi 8653, P. fluorecens 8573, Serratia marcescens*).

Чисті лінії бактеріофагів отримували шляхом багаторазового пасування з використанням методу виколювання окремих негативних колоній. Були отримані ізоляти бактеріофагів, які надалі використовувались для напрацювання їх в необхідних концентраціях та об'ємах.

Для вирощування, зберігання та використання бактерій, а також для титрування бактеріофагів були використані готові комерційні агаризовані поживні середовища.

Розведення фагів проводили на 0,9% фізіологічному розчині, приготовленому згідно інструкції підприємства-виробника. Титр визначали користуючись методом по Граціа.

Зони лізису, або “бляшки” – це локалізовані популяції бактеріофагів, які стають видимими, оскільки вони локально зменшують кількість чутливих бактерій-хазяїв. Зазвичай вони розвиваються на бактеріальних «газонах», висіяних на твердих або напівтвердих середовищах на основі агару. Ці бляшки походять від одного фагового віріону або інфікованої бактерії, які разом називаються бляшкоутворюючими одиницями (БУО), і поширюються сферично, утворюючи кругові області зниженої каламутності всередині бактеріального газону. Фагові бляшки представляють загальний і доступний

сценарій для спостереження за просторово структурованим ростом фагів у лабораторних умовах, служачи приблизними моделями динаміки популяції фагів у природно структурованих популяціях бактерій. Крім того, фагові бляшки зазвичай використовуються для ізоляції фагів, очистки та підрахунку, що дозволяє спостерігати за активністю досліджуваних бактеріофагів. Окрім того, їх можна використовувати для біологічної характеристики фагів, включаючи оцінку ефективності їх посіву та діапазону хазяїв.

2.2. Титрування по Граціа

Метод титрування фагів по Граціа (названий на честь А. Gratia, бельгійського мікробіолога), полягає у визначенні кількості активних фагових часток в 1 мл субстрату, шляхом внесення зразка в агар (0,7%), що вміщує чутливу до фага бактеріальну культуру, із подальшим нашаруванням суміші на щільний агар (1,5%) у чашці Петрі, термостатируванням і візуальним підрахунком кількості негативних колоній .

При титруванні методом по Граціа використовували розведення вірусовмісного матеріалу у фізіологічному розчині. Роботи проводилися у стерильних умовах. Чашки та пробірки підписували відповідно до розведення вірусу.

У 0,7% поживне агаризоване середовище додавали змив бактеріальної культури (0,4 мл), 1 мл вірусовмісного матеріалу відповідного розведення і виливали на чашку з 1,5% поживним агаризованим середовищем. Після цього чашки ставили у термостат на 12 год [23].

Визначення титру по Граціа дозволяє отримати більш точні результати, а також визначити кількість біологічно активних фагів у одному мілілітрі, перераховане до коефіцієнта розведення. Використання даного методу застосовували при виколюванні окремих колоній та визначенні морфології негативних колоній фагів.

2.3. Визначення спектру літичної активності фагів

В роботі використовували бактеріальні культури, які відносяться до 7 різних видів: *P. syringae pv. tabaci 223, P. syringae pv. tabaci 8646, P. syringae pv. phaseolicola 4228, P. syringae pv. phaseolicola 4013, P. syringae pv. cerasi 8653, P. fluorecens 8573, Serratia marcescens*. Це дозволило встановити коло чутливих хазяяїв у межах даної групи.

З цією метою на чашки з тестовою культурою наносили сітку, пронумеровану такою кількістю клітинок, щоб вистачило для всіх відібраних для дослідження фагів. Бактеріофаги розводили до концентрації 10^6 БУО/мл, адже для проведення методу дана концентрація є оптимальною. Далі тестовані бактеріофаги наносили на чашки з чутливими культурами. На кожну окрему клітинку сітки наносили 10 мкл фагової суспензії й інкубували при 25˚С 18–24 годин, після чого фіксували результати за наявністю зон лізису [24].

2.4. Препаративне отримання фагів їх очистка та концентрація

Для роботи використовували концентровані та очищені вірусні суспензії, отримані з фаголізатів.

З метою їх отримання використовували такі методи:

1. Накопичення лізатів шляхом отримання зливного лізису негативних колоній фагів на чашках Петрі;
2. Культивування чутливих бактерій та їх лізис під впливом фагів у бульйоні чи іншому рідкому поживному середовищі з використанням інтенсивної аерації.

При використанні першого методу проводили титрування фагів для встановлення тест розведення. Тест - розведення - це така концентрація фагів

в 1 мл суспензії, яка дозволяє отримати газон негативних колоній при висіві на чашку з чутливою культурою, які доторкуються краями між собою. Такі газони дозволяли отримати максимальний вихід фагів до 10^{11} БУО/мл. При висіві фагу, що утворює суцільний лізис, його вихід падав майже у 10 разів.

Чашки з утвореними фагами тест-газонами заливали на ніч 5 мл стерильного фізіологічного розчину та зберігали в холодильнику при 4°С. Потім зливали з чашок фізіологічний розчин з екстрагованими фаговими частинками та центрифугували.

2.5. Накопичення бактеріофагів

Для накопичення фагів використовували метод культивування чутливих бактерій та їх лізису під впливом бактеріофагів у комерційному поживному бульйоні з використанням інтенсивної аерації, при температурі 25°С. Додавали 150 – 200 мл комерційного поживного бульйону, 100 мкл фаговмісного матеріалу, отриманого з виколотих окремих негативних колоній (чиста лінія бактеріофагів) і змив бактеріальної культури. Подачу повітря виконували за допомогою компресору.

Завдяки аерації культура скоріше переходить у log–фазу, а вихід фагів вищий. Фаг вносили з множиною інфекції 1:10. Момент лізису при цьому фіксували під час інтенсивного піноутворення, при цьому клітинні уламки осідали на дно колби, а бульйон світлішав. Після чого аерацію припиняли, лізати звільняли від зруйнованих бактеріальних клітин і до фаголізату додавали хлороформ [25]. Їх інфекційний титр складав 10^9 – 10^{10} БУО/мл.

Для освітлення фаголізатів використовували центрифугування при 5000g протягом 30 хвилин.

2.6. Електронна мікроскопія

Для визначення морфологічної структури досліджуваного бактеріофагу була використаний метод електронної мікроскопії. Використання електронного мікроскопу дозволяє візуалізувати структурні особливості та класифікувати вірусологічні зразки без попереднього детального вивчення інфекційного агенту.

Відмінною особливістю трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) є її здатність пропонувати комплексне уявлення, що дозволяє миттєво оцінити поточну ситуацію, включаючи ідентифікацію кількості та морфології присутніх вірусів, навіть неочікуваних. Як правило, морфологія, що спостерігається за допомогою ТЕМ, дає можливість швидкої початкової класифікації на рівні родини, спираючись на такі фактори, як: структура частинок, розмір і стабільність. Таким чином, ТЕМ виступає в якості вирішального інструменту при прийнятті рішення про те, який із доступних методів, таких як біологічні аналізи, серологічні аналізи або методи молекулярної біології, слід застосувати для більш точного визначення роду та виду вірусу.

Окрім клінічних діагностичних застосувань, електронна мікроскопія (ЕМ) має важливе значення для вивчення складних структурних характеристик вірусів. Це дослідження допомагає зрозуміти роль, яку відіграють різні вірусні компоненти. Зокрема, білки, розташовані на поверхні вірусів, полегшують їх зв’язування з клітинами та проникнення в них, а також викликають імунні відповіді.

2.7. Визначення термінів збереження біологічної активності фагів

Один з етапів роботи включав визначення термінів біологічної активності ізолятів бактеріофагів за різних температурних режимів. Протягом шести

місяців, з початку жовтня 2023 року по березень 2024 року проводили повторні визначення титру кожного фагу при різних температурних режимах, що в подальшому дозволить проаналізувати, яка температура є оптимальною для збереження інфекційної активності для кожного досліджуваного ізоляту. Результати даного етапу зможуть в подальшому стати важливою складовою за дослідження питання фаготерапії різноманітних фруктових та\або овочевих культур. Для орієнтовної оцінки концентрації бактеріофагів та проведення подальших, більш складних експериментів без потреби великої кількості чашок Петрі, застосовували краплевий тест, або "спот-тест". Для цього, досліджувані фаголізати з трьох різним температурних діапазонів у рідкому вигляді титрували з використанням лабораторних плашок. Для кожного досліду використовували по дев’ять чашок Петрі, в які попередньо наливали комерційний поживний агар. Кожну основу чашок Петрі ззовні було розділено на дев’ять частин за допомогою маркера та пронумеровано від одного до дев’яти. Опісля застигання агару на поверхню виливали суміш розчину, що містив індикаторну бактеріальну культуру та верхній м’який шар агару. Після того чашки необхідно закрити кришкою та поставити на рівну поверхню для подальшого рівномірного застигання. У той час проводиться титрування бактеріофагів і згодом на кожний відмічений сектор на чашці за допомогою самплера на 100 мкл наноситься крапля досліджуваного розведення фага.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Виділення ізолятів фагів із рослин з ознаками бактеріозів

Бактерії є поширеними збудниками хвороб багатьох економічно важливих видів рослин, а тому вивчення екологічних, епідеміологічних та патофізіологічних особливостей бактерій є важливим завданням для науковців. Плямистість на плодах та листкових пластинках, опіки, рак, в'янення, виділення ексудату є характерними ознаками бактеріозу. Серед найбільш шкодочинних фітопатогенних бактерій виділяють наступні види: *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas sp.*, *Erwinia amylovora*, *Xylella fastidiosa*, *Pectobacterium sp.*, та багато інших [26].

Більшість наукових робіт, опублікованих з цієї теми стосуються бактерій родини *Enterobacteriaceae*, серед яких є патогенні для людей види, що викликають харчові отруєння, деякі з цих бактерій можуть взаємодіяти з рослинами. Прикладом таких бактерій є *Serratia marcescens*, що зустрічається на різних типах ґрунтів.

Виділення бактеріофагів проводили зі зразків картоплі, моркви, буряку та перцю, отриманого із овочесховища Київської області. Фаги були використані у тестових експериментах для визначення можливого кола хазяїв до бактеріальних культур. Вибір індикаторних культур був зумовлений високою питомою вагою фітопатогенних бактерій цих родів серед збудників, що викликають хвороби вищевказаних овочевих культур та циркулюють в агроценозах.

Для виділення ізолятів фагів були відібрані плоди, які мали виражені симптоми бактеріозів, а саме мацеровану гниль. За зберігання плодів симптоматика покращувалась і тканини все більше пом'якшувались та

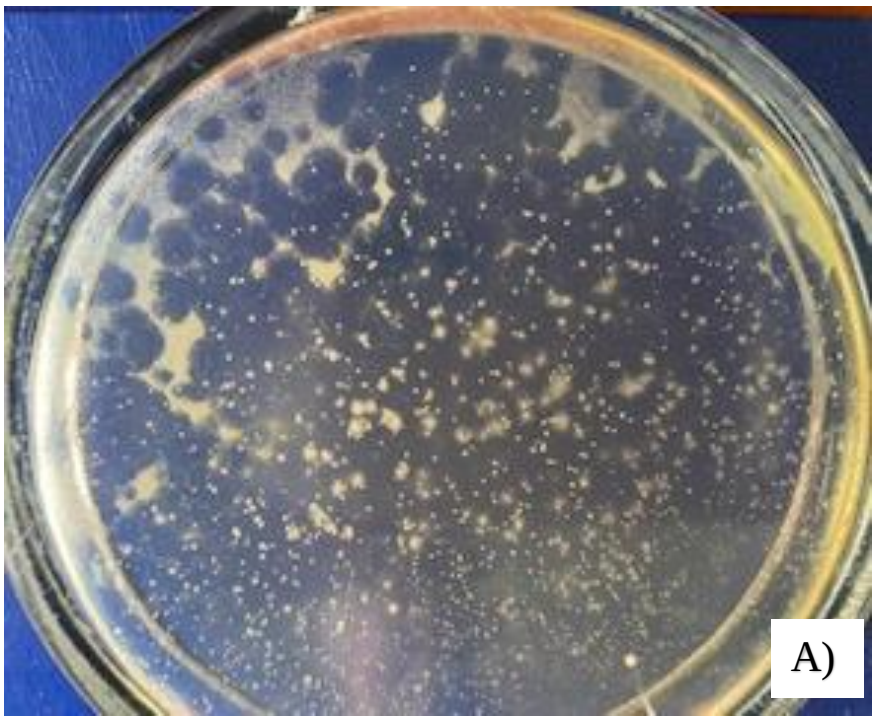
виділяли характерний запах, перетворюючись на слизову масу коричневого, або бурого кольорів.

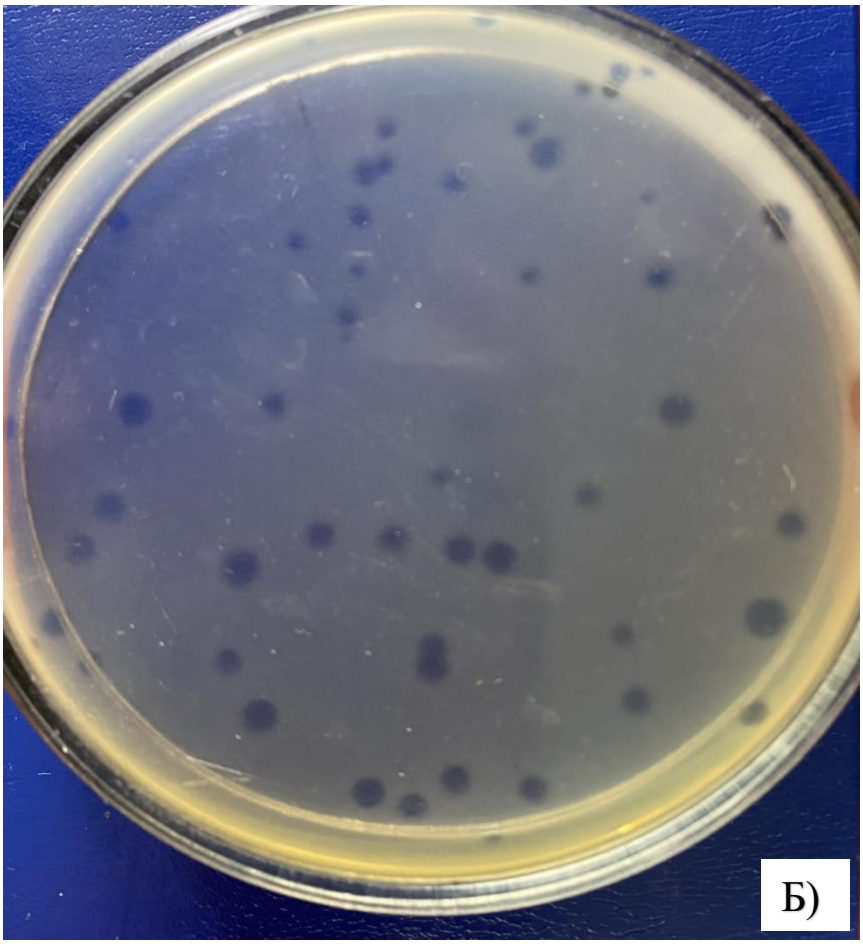
В подальшому в дослідженнях використовували отримані фаголізати (зразки заливались фізіологічним розчином).

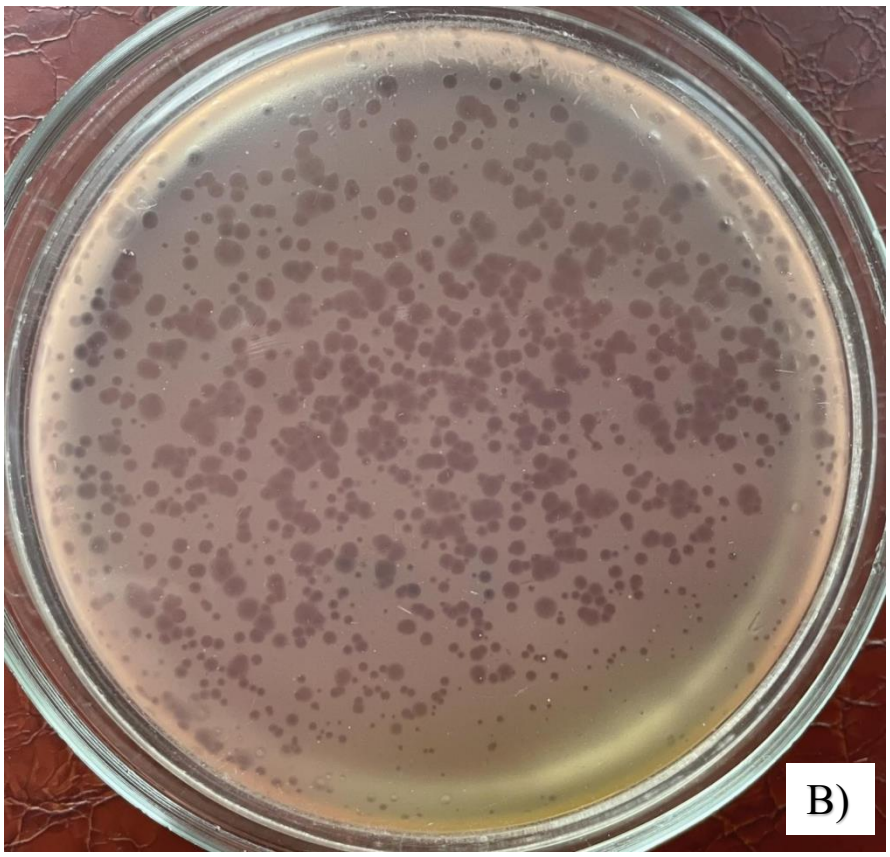
Для вивчення і дослідження ізолятів фагів використовували метод висіву фаголізатів на поживне середовище. В подальшому, отримавши негативні колонії бактеріофагів, було визначено морфологію негативних колоній та встановлено титр ізолятів фагів.

Результати титрування за Граціа, проведеного з використанням чутливої бактеріальної культури *Pseudomonas fluorescens 8573, P. syringae pv. phaseolicola 4013, Serratia marcescens* та фагів 8573/B, 8573/M, 4013/M та Ser/1 у лабораторії показали, що отримані негативні колонії бактеріофагів за морфологією мають і спільні, і окремі диференційні риси. До схожих ознак відноситься: прозорі негативні колонії. Відрізняються негативні колонії характерно за своїми розмірами. Ізолят фагу Ser/1 утворює найбільші за розмірами негативні колонії діаметром від 3±1 до 4±1 мм, ізолят фагу 8573/B, 8573/M - бляшки діаметром 1-2±0,5 мм та 2-4±1 мм та ізоляти фагу 4013 - бляшки діаметром 1 мм (рис. 3.1).

Для отримання чистих ліній – проводили не менше трьох пасажів.


А)


Б)


В)

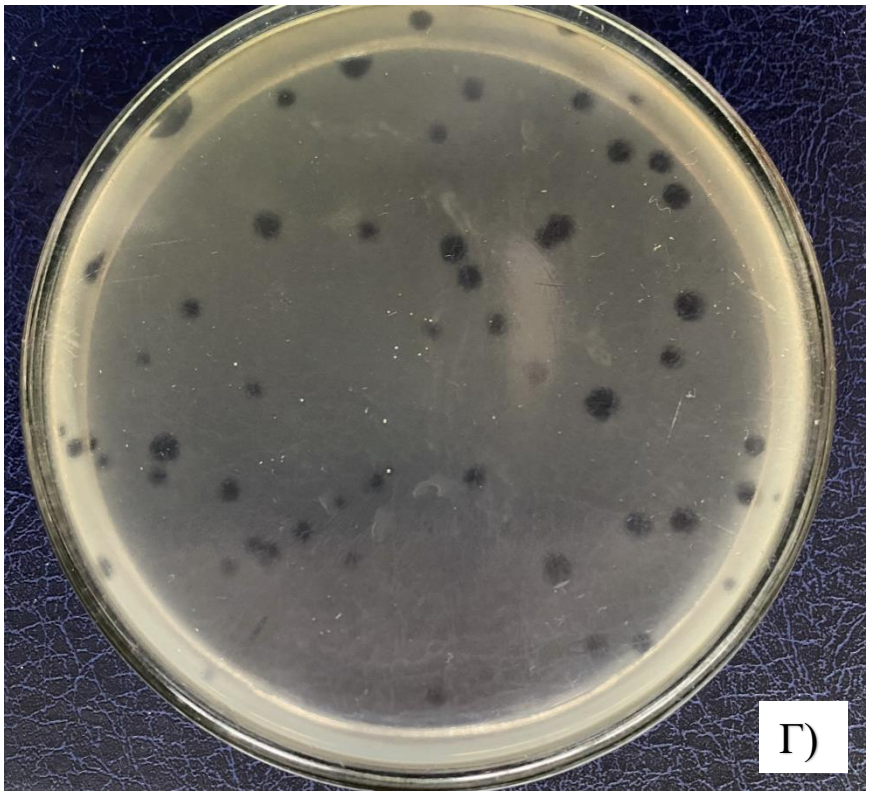

Г)

Рис. 3.1. Морфологія негативних колоній чутливих бактеріальних колоній: А) *Pseudomonas fluorescens* 8573/В; Б) *Serratia marcescens*; В) *Pseudomonas fluorescens* 8573/М; Г) *Pseudomonas fluorescens* 8573/В; Д) *P. syringae pv. phaseolicola* 4013

Порівняння морфології негативних колоній досліджуваних бактеріофагів фіксує їх відмінності між собою, а детальніше вивчення їх властивостей є важливим для покращення наукових дослідів, які зосереджені на винаході препаратів проти патогенної дії фітобактерій.

3.2. Спектр літичної активності бактеріофагів

Літична дія бактеріофагів по відношенню до різних штамів мікроорганізмів є одним із основних їх біологічних властивостей. Для визначення спектру літичної активності бактеріофагів традиційно використовується ряд стандартних мікробіологічних методів таких як висів на

агаризоване середовище методом двошарового агару [27], методом “фагової доріжки” [28] і метод реплік [29]. Оскільки процедура визначення фагочутливості культури клітин достатньо довготривала, розробка методу експрес-аналізу чутливості мікробних кліток до бактеріофагів є важливою.

При вивченні репродукції вірусів бактерій в екосистемах важливою властивістю є спектр їх літичної активності, встановлення якого дозволяє враховувати можливі шляхи переносу генетичної інформації в природі.

За спектром літичної активності, фаги були перевірені на 7 штамах бактерій, які відносились до двох родів *Pseudomonas* та *Serratia* (табл. 3.1).

Результати проведення досліджень визначення спектру літичної активності бактеріофагів Ser/1, 8573/B, 8573/M та 4013/M наведені у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Спектр літичної активності бактеріофагів

Культура	Фаги			
	Ser/1(*Serratia marcescens)*	8573/B	8573/M	4013/M
P. syringae pv. tabaci 223	+	-	-	+
P. syringae pv. tabaci 8646	-	-	-	-
P. syringae pv. phaseolicola 4228	+	-	-	-
P. syringae pv. phaseolicola 4013	-	+	+	+
P. syringae pv. cerasi 8653	-	-	-	-
P. fluorecens 8573	-	+	+	-

Serratia marcescens	+	+	+	-

За отриманими результатами, згідно табл. 3.1, у п’яти з семи зразків були зафіксовані ділянки лізису бактерій, інфікованих одним або декількома різними бактеріофагами.

Широкий спектр літичної активності мали ізоляти всіх фагів: Ser/1, 8573/М, 8573/В та 4013/М. Вони лізували фітопатогенні бактерії родів *Serratia marcescens*, *Pseudomonas syringae pv. phasedicola 4013, Pseudomonas fluorescens 8573*, що відносяться до різних видів. Ізоляти фагів виявилися полівалентними.

До інших, використаних в роботі штамів бактерій, біологічна активність ізолятів фагів не проявлялась.

Серед досліджуваних ізолятів фагів, які проявляли літичну активність по відношенню до культур, є досить широко поширеним в природі патогенами, можливо в процесі еволюції віруси пристосувалися до репродукції на різних чутливих культурах.

Таким чином, виділені ізоляти мають різні властивості, які відрізняються не лише за колом чутливих хазяїв, ефективністю висіву на різних індикаторах, а також за морфологією і розміром негативних колоній.

3. 3. Електронна мікроскопія

Після проведення електронної мікроскопії досліджуваних ізолятів Ser/1, 8573/М, 8573/В та 4013/М, встановили, що за морфолого-структурною організацією фаги мають ікосаедричну головку, довгий та короткий хвостовий відросток. Визначено розміри віріонів: ізолят фагу Ser/1 (рис. 3.2) має головку розміром 87±2 нм, хвостовий відросток 105±2 нм, 8573/В (рис. 3.3) - головку 80±2 нм, хвостовий відросток 17±1 нм, фаг 8573/М (рис. 3.4) має головку

розміром 65±2 нм та хвостовий відросток 9±3 нм, а ізолят фагу 4013/М (рис. 3.5) має хвостовий відросток розміром 10±3 нм та головку 72±3 нм. Визначити таксономічну належність бактеріофагів без проведення полімеразно-ланцюгової реакції неможливо, проте, розглянувши морфолого-структурні особливості ізолятів ми висунули припущення, що фаги 4013/М, 8573/М та 8573/В відносяться до подоподібних вірусів, а фаг Ser/1 - до сифоподібних вірусів. Різниця полягає зокрема у будові хвостового відростку, адже у подоподібних вірусів вони складаються з одного білку, а у сифоподібних - з декількох білків.

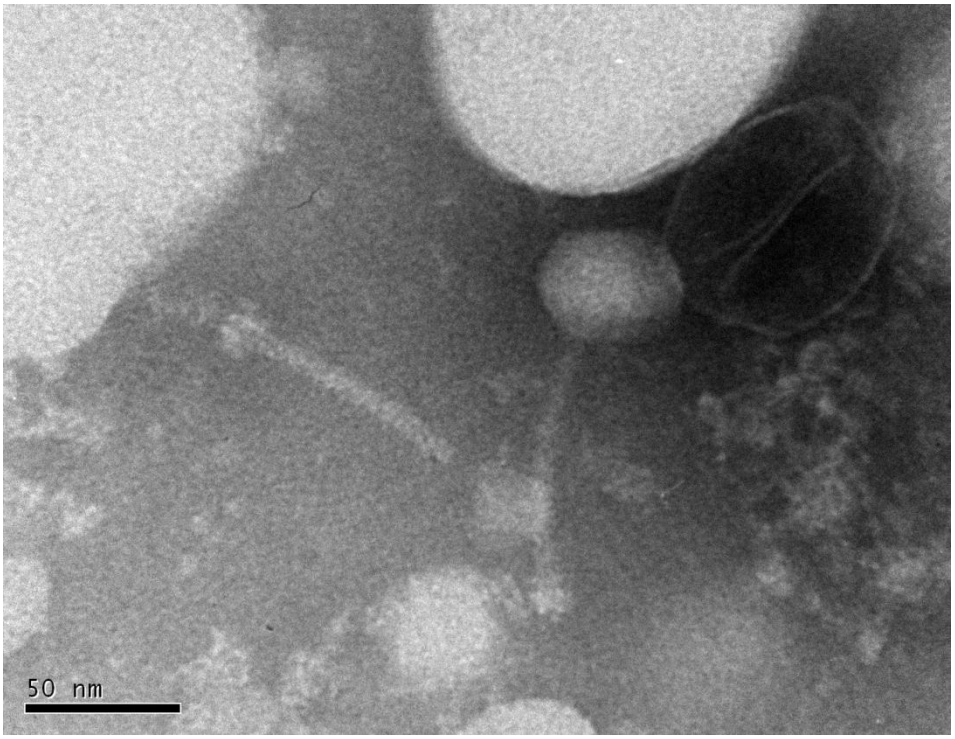


Рис. 3.2. Електронномікроскопічне зображення бактеріофагу *Ser/1*

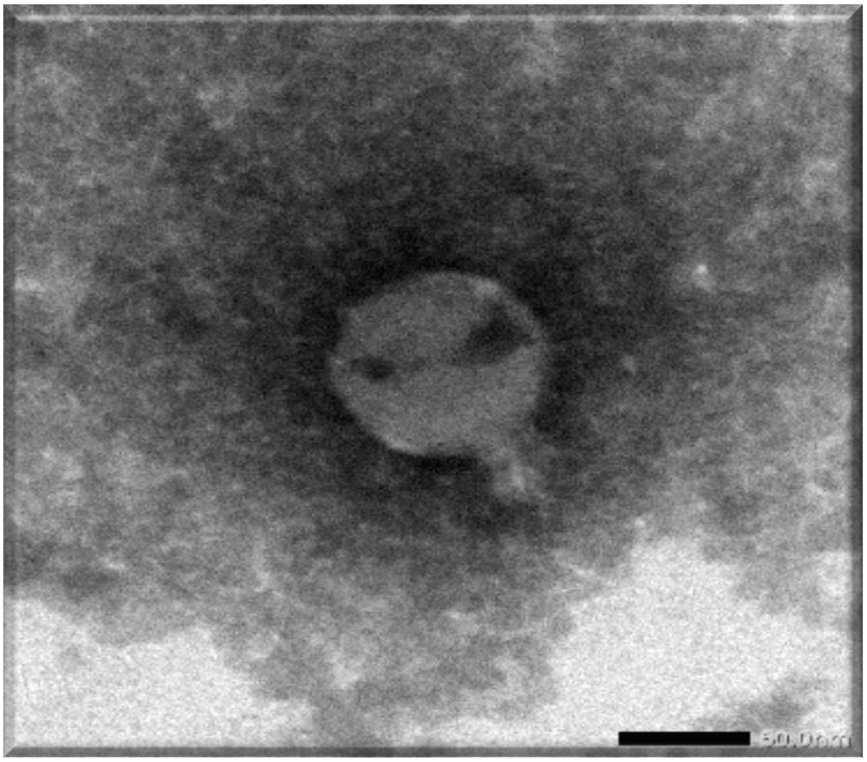


Рис. 3.3. Електронномікроскопічне зображення бактеріофагу *8573/B*

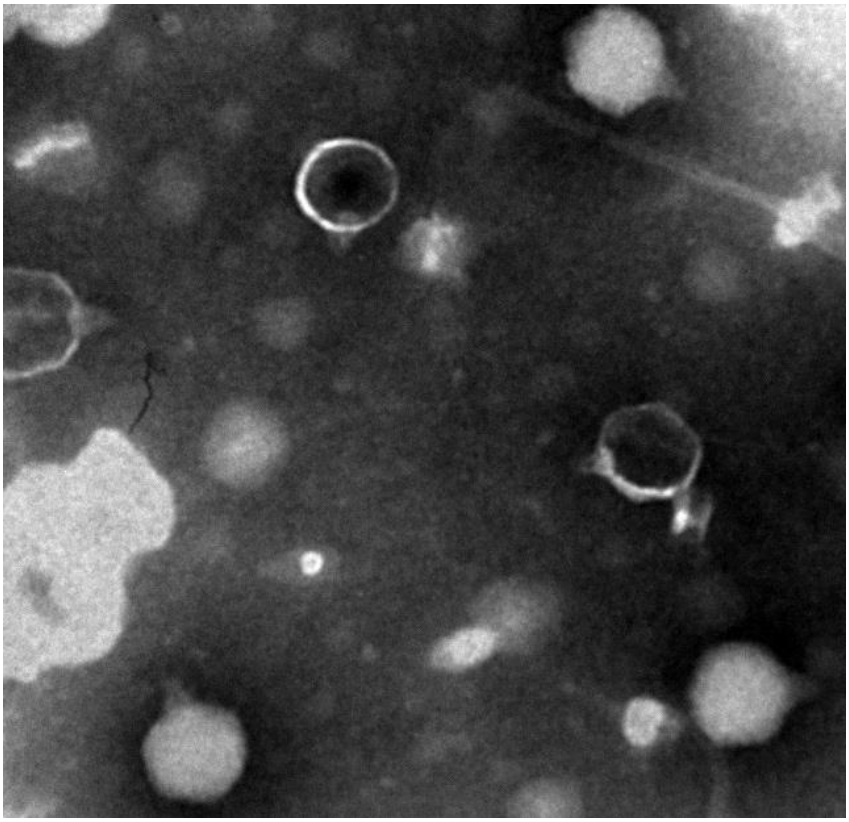


Рис. 3.4. Електронномікроскопічне зображення бактеріофагу *8573/M*

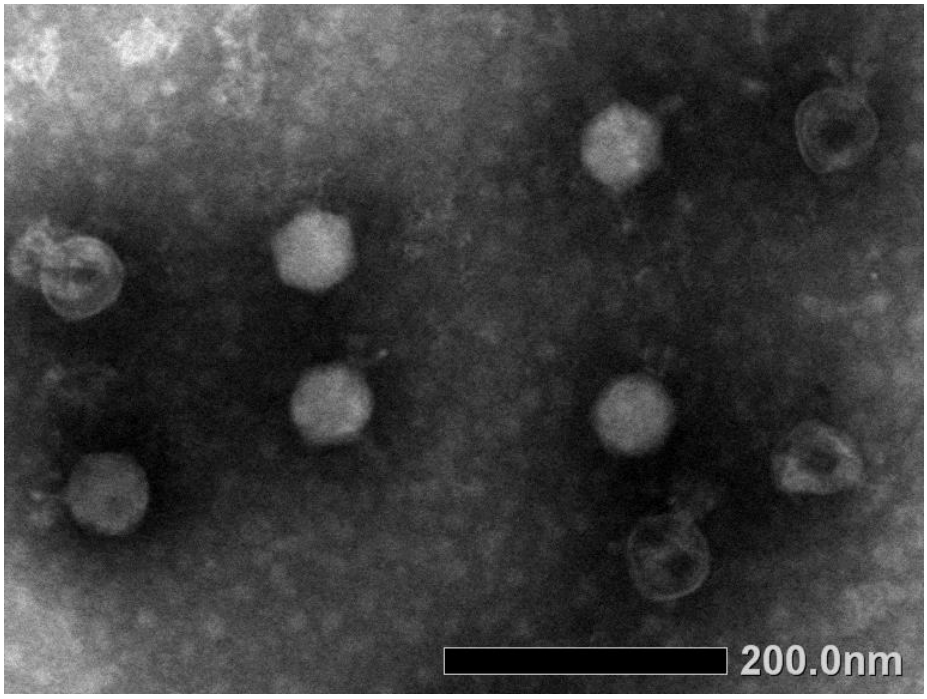
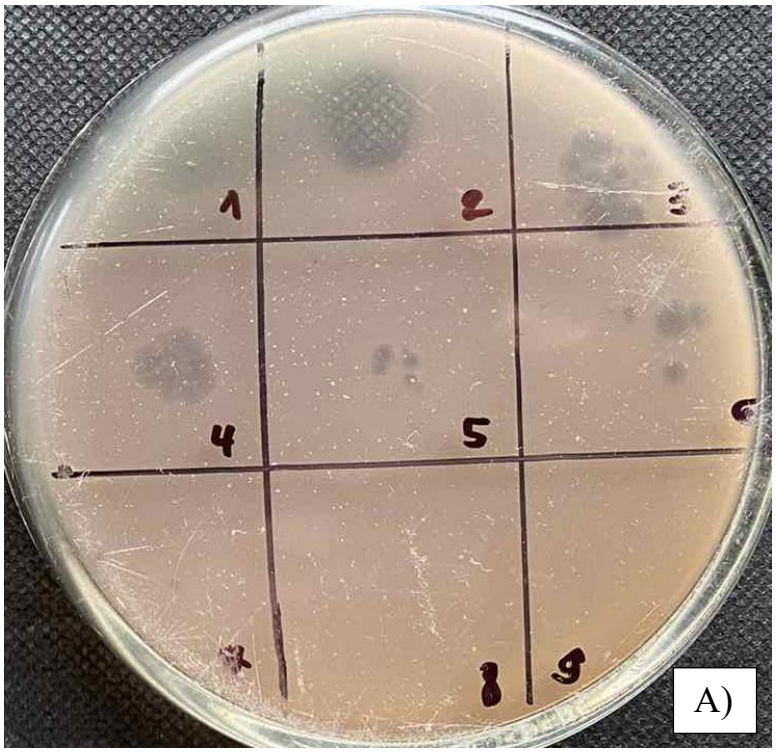


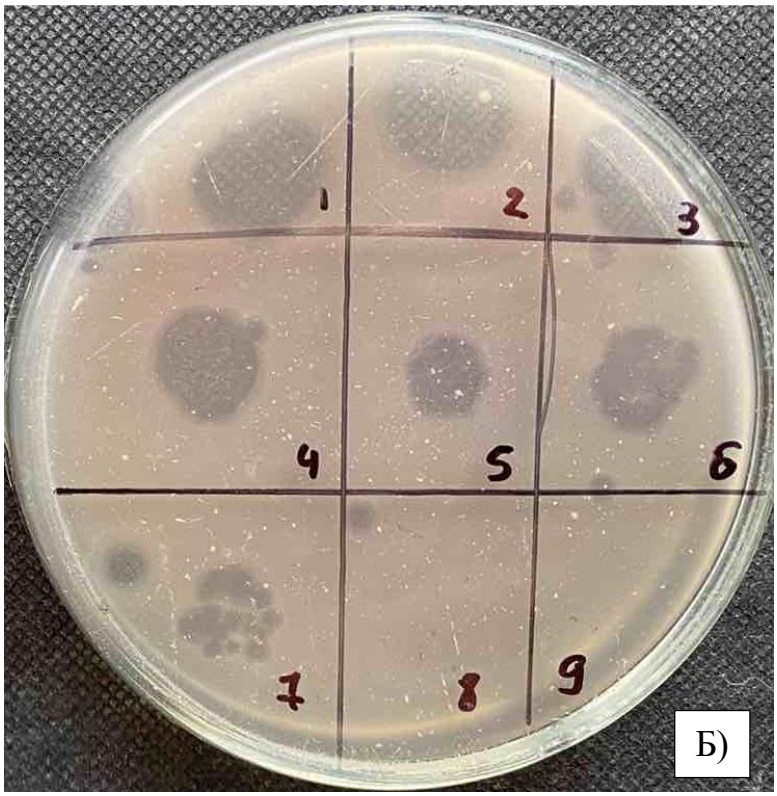
Рис. 3.5. Електронномікроскопічне зображення бактеріофагу *4013/M*

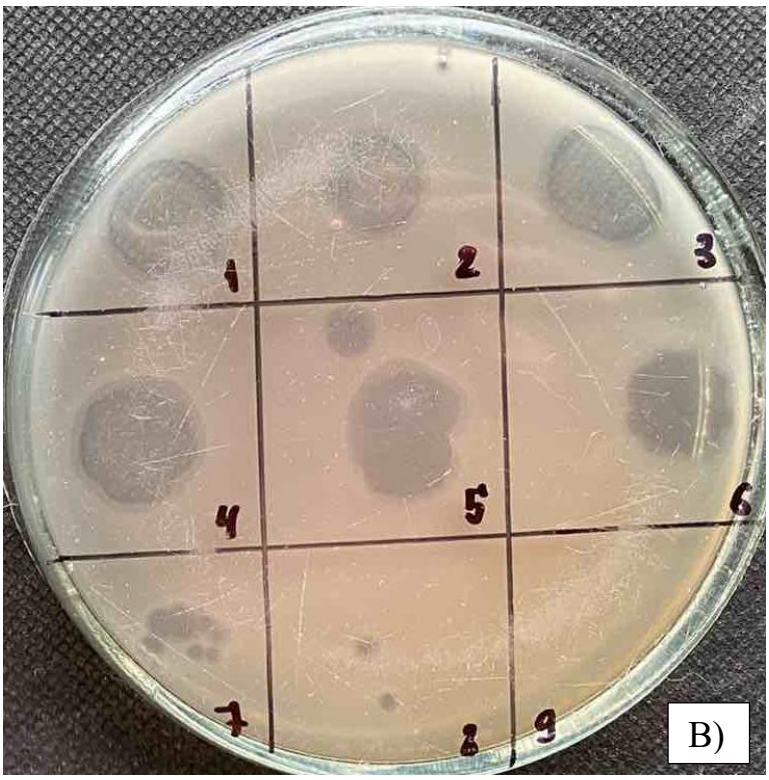
Таким чином, було вивчено властивості досліджуваних фагів, за допомогою таких основних критеріїв, як: морфологія негативних колоній, морфологія і розмір віріонів.

3.4. Проведення методу “Спот-Тест”

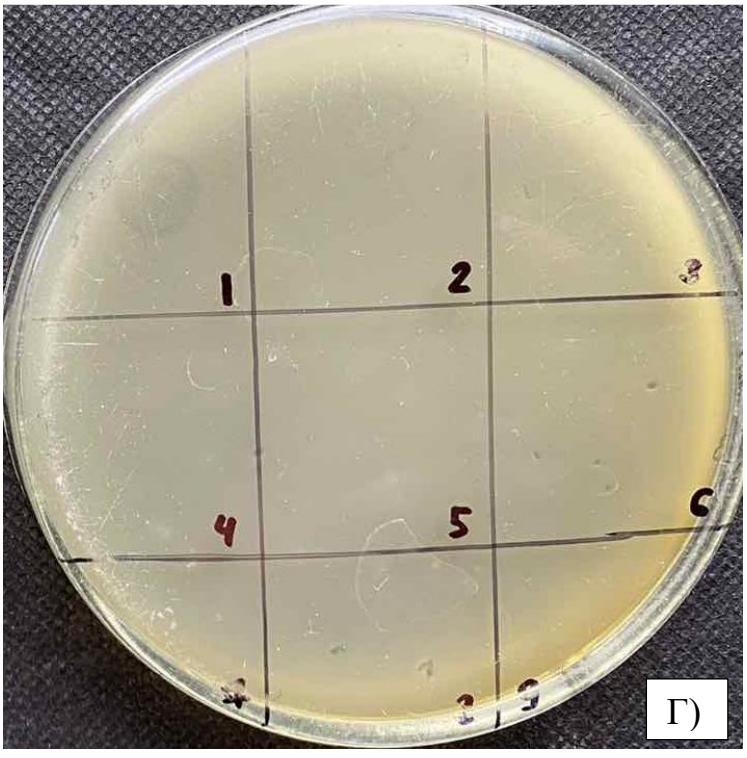
Використовуючи метод Спот-тест було встановлено інфекційну активність всіх досліджуваних ізолятів фагів протягом шести місяців, результати одного з експериментів представлені на рис.3.6. Завдяки даному дослідженню визначили титри досліджуваних бактеріофагів, а отже - провели порівняльний аналіз їх стабільності та біологічної активності в умовах різних температурних діапазонів.


1
2
3
4
5
6
8
9
А)

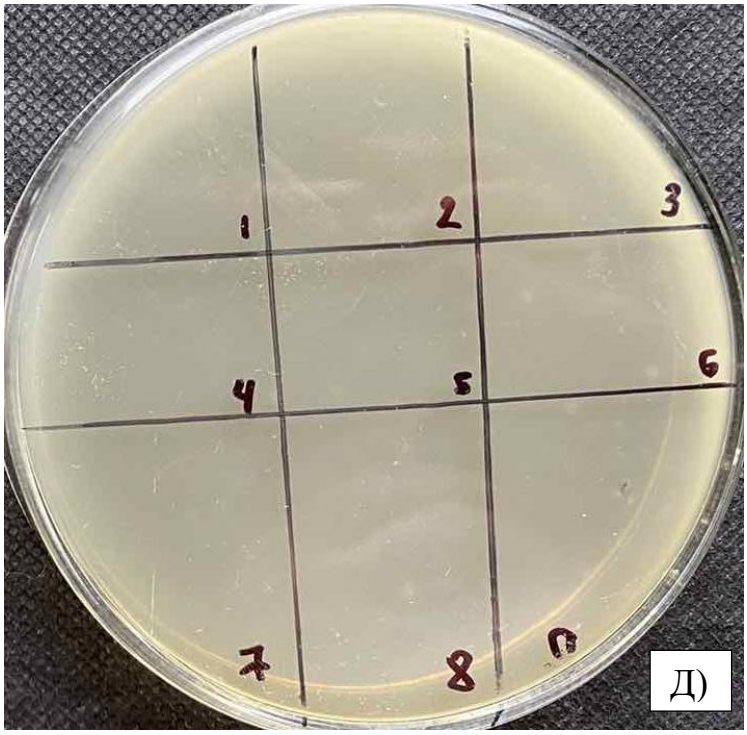

1
2
3
4
5
6
7
8
9
Б)



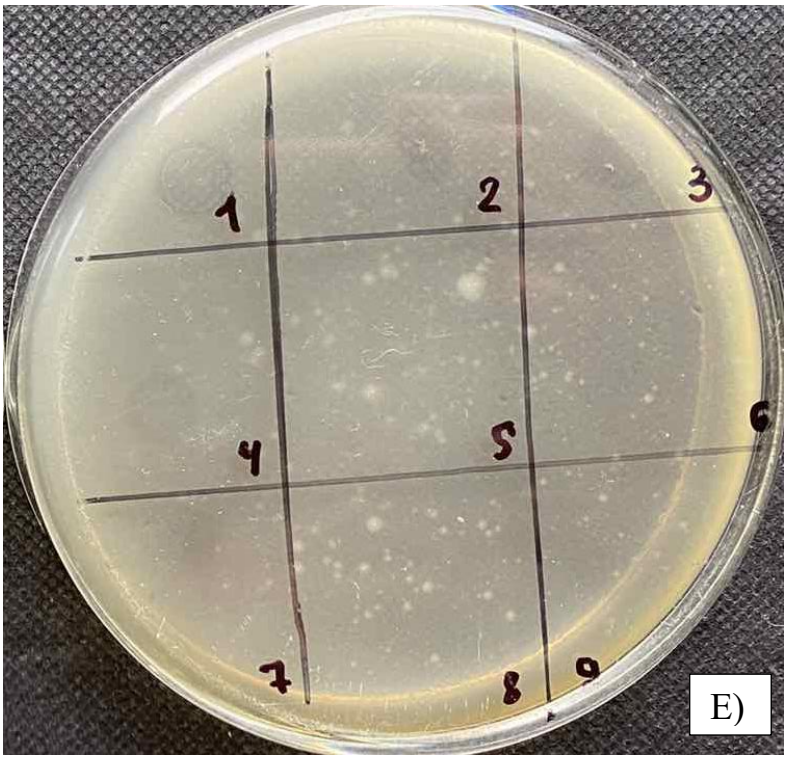
В)



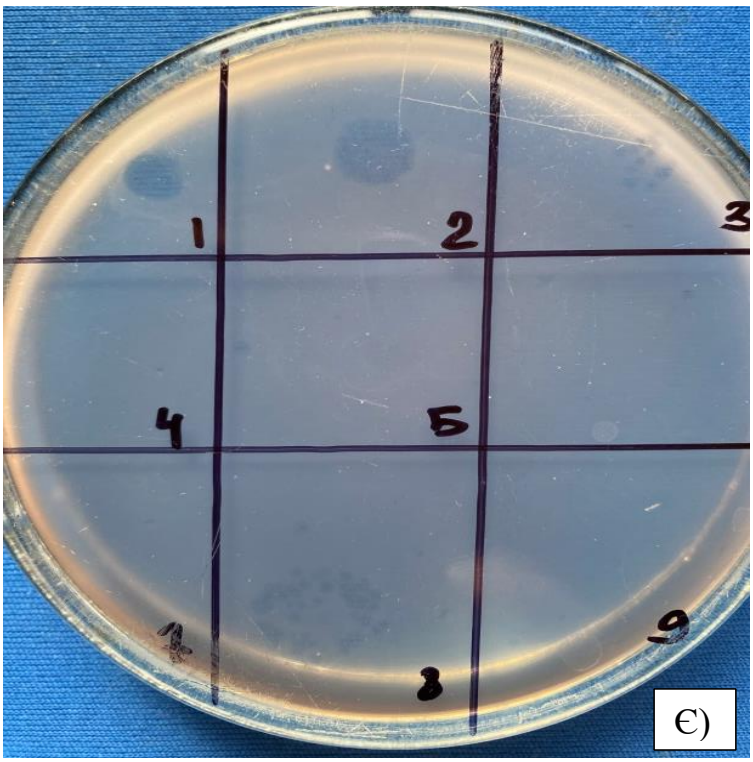
Г)

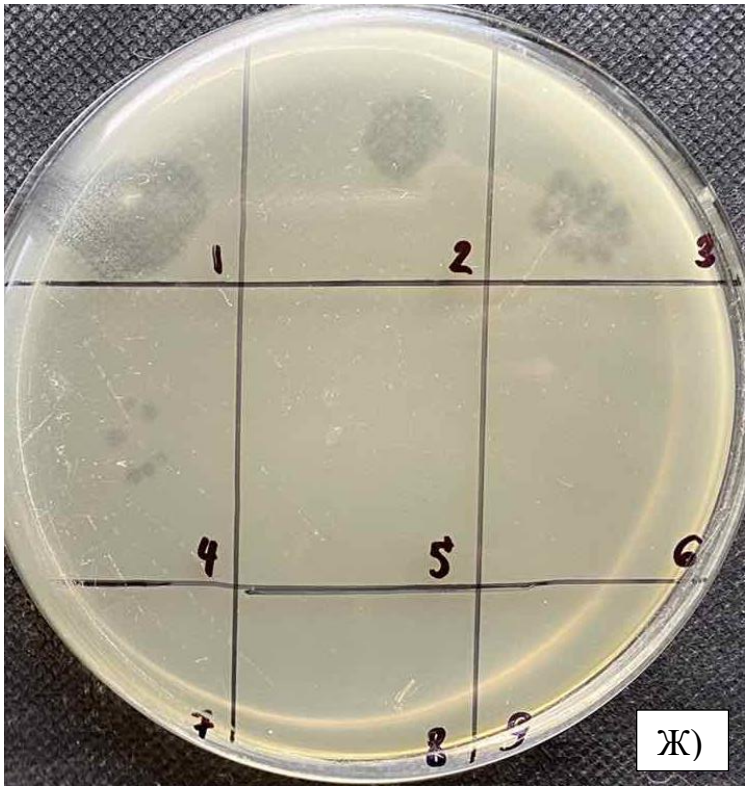


Д)



Е)


1
2
3
4
5
9
8
Є)


1
2
3
4
5
6
8
Ж)

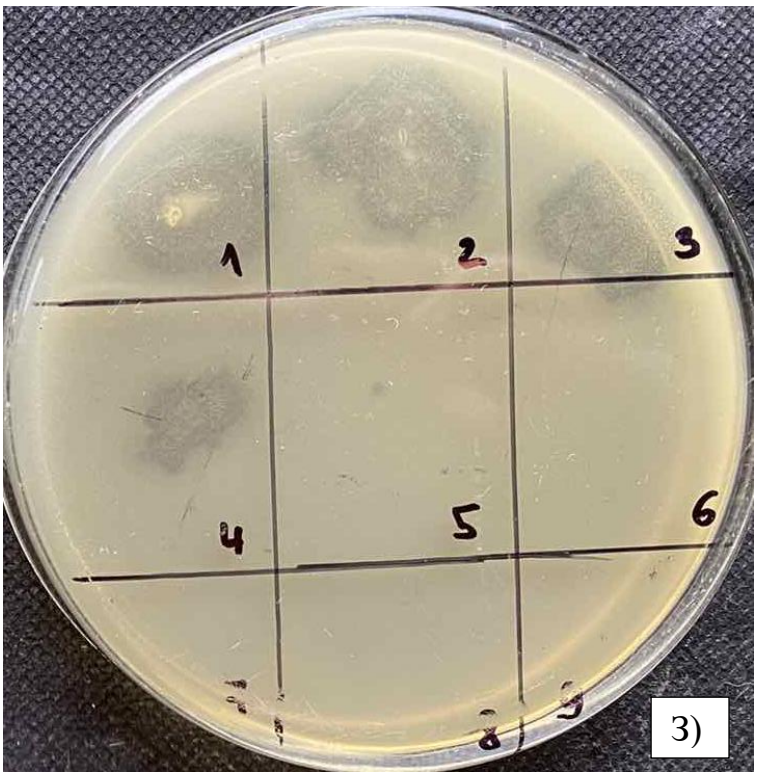


Рис. 3.6. Біологічна активність ізолятів фагів методом “Спот-тест”: А) *Serratia marcescens*, Т = +25°С; Б) *Serratia marcescens*, Т = +15°С; В) *Serratia marcescens*, Т = +4°С; Г) *P. syringae pv. phaseolicola* 4013, Т = +25°С; Д) *P. syringae pv. phaseolicola* 4013, Т = +15°С; Е) *P. syringae pv. phaseolicola* 4013, Т = +4°С; Є) *Pseudomonas fluorescens* 8573/В, Т = +25°С; Ж) *Pseudomonas fluorescens* 8573/В, Т = +15°С; З) *Pseudomonas fluorescens* 8573/В, Т = +4°С

Визначення титру бактеріофагів проводилось за візуальними показниками, використовуючи наявність зон лізису як індикаторів наявності біологічної активності фагів у кожному з накреслених секторів. Таким чином було проведено три повторні експерименти, що дало змогу дослідити динаміку їх біологічної активності.

3.5. Визначення термінів збереження біологічної активності фагів

Для перевірки термостабільності ізолятів фагів при тривалому зберіганні використовували фаголізати у поживному бульйоні. Як показали дослідження поживний бульйон підвищує стабільність і сприяє збереженню фагів, а також дозволяє отримувати їх у більш високих титрах у порівнянні з мінеральними середовищами. У зв'язку з чим для використання з практичною метою в господарствах фагів доцільно використовувати саме лізати на поживному бульйоні.

Під час виконання дослідів також було проведено експериментально статистичну роботу задля перевірки біологічної активності досліджуваних ізолятів в умовах різних температурних діапазонів. Отримані результати дозволили оцінити витривалість фагів та краще оцінити можливості їх адаптивності до умов оточуючого середовища.

При температурі в 4°С титри бактеріофагів зростали у повільному темпі протягом місяців на незначну кількість. Зокрема, фаг Ser/1 показав вищу стабільність і найвищі титри серед трьох досліджуваних бактеріофагів. (рис. 3.6).

При збереженні фагів при температурі 4°С помітної зміни інфекційних властивостей фагів не відмічено.

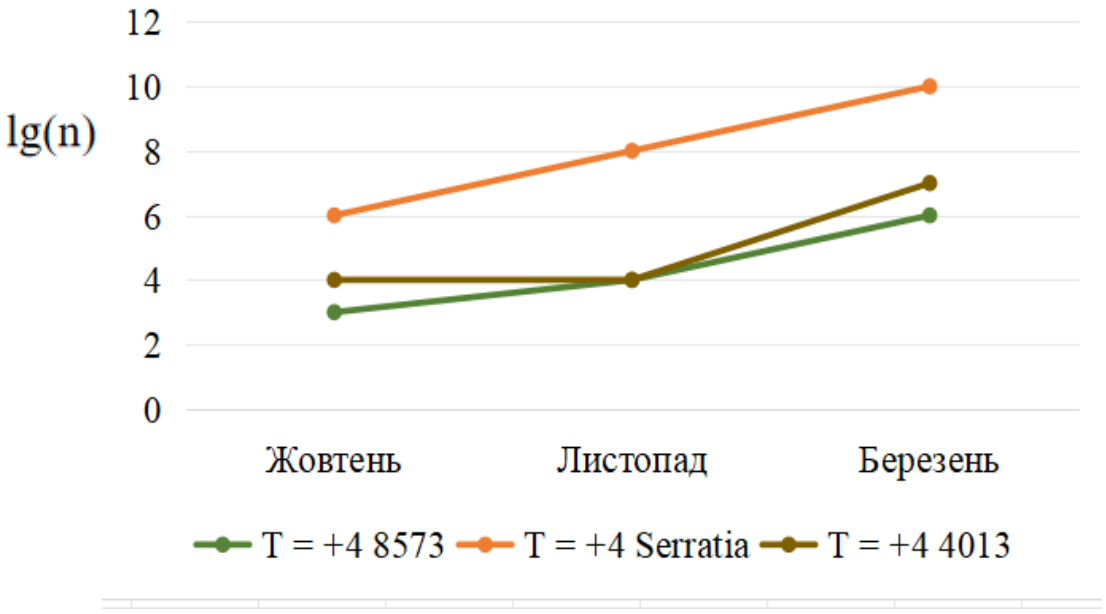


Рис. 3.7. Динаміка збереження інфекційного титру фагів при 4°C

Наступним температурним діапазоном були зберігання зразків при 15°C. Результати титрів фагів не були ідентичні минулому етапу і показали незначне коливання у показниках, де станом на листопад титр фагу Ser/1 понизився на одну позначку, проте згодом продовжив рости. При цьому він все ще мав найвищий показник стабільності серед всіх досліджуваних фагів, що може свідчити про його ефективний і вигідний біологічний та економічний потенціал при використання у фаготерапії. Інші фаги залишалися стабільними та показували підвищення титрів до березня місяця включно (рис. 3.7).

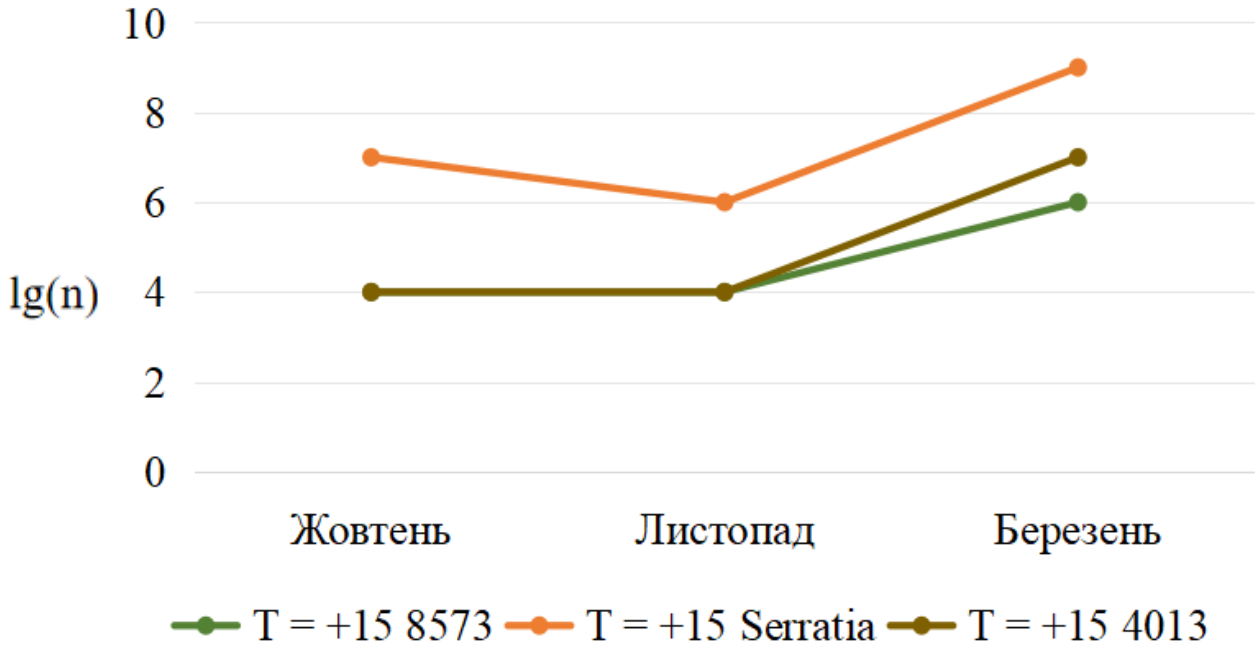


Рис. 3.8. Динаміка збереження інфекційного титру фагів при 15°C

При температурі 25°C можна спостерігати тенденцію до спаду біологічної активності ізолятів фагів 8573 та 4013. Ми встановили, що титри досліджуваних фагів, станом на березень, критично знизились, що свідчить про те, що температура вище 25 градусів за Цельсієм є фактором, який негативно впливає на біологічну активність бактеріофагів, що

використовувались у нашій роботі. Фаг Ser/1, однак, знову показав стабільну активність протягом більшого проміжку часу з незначним підвищенням у першій місяць проведення експерименту.

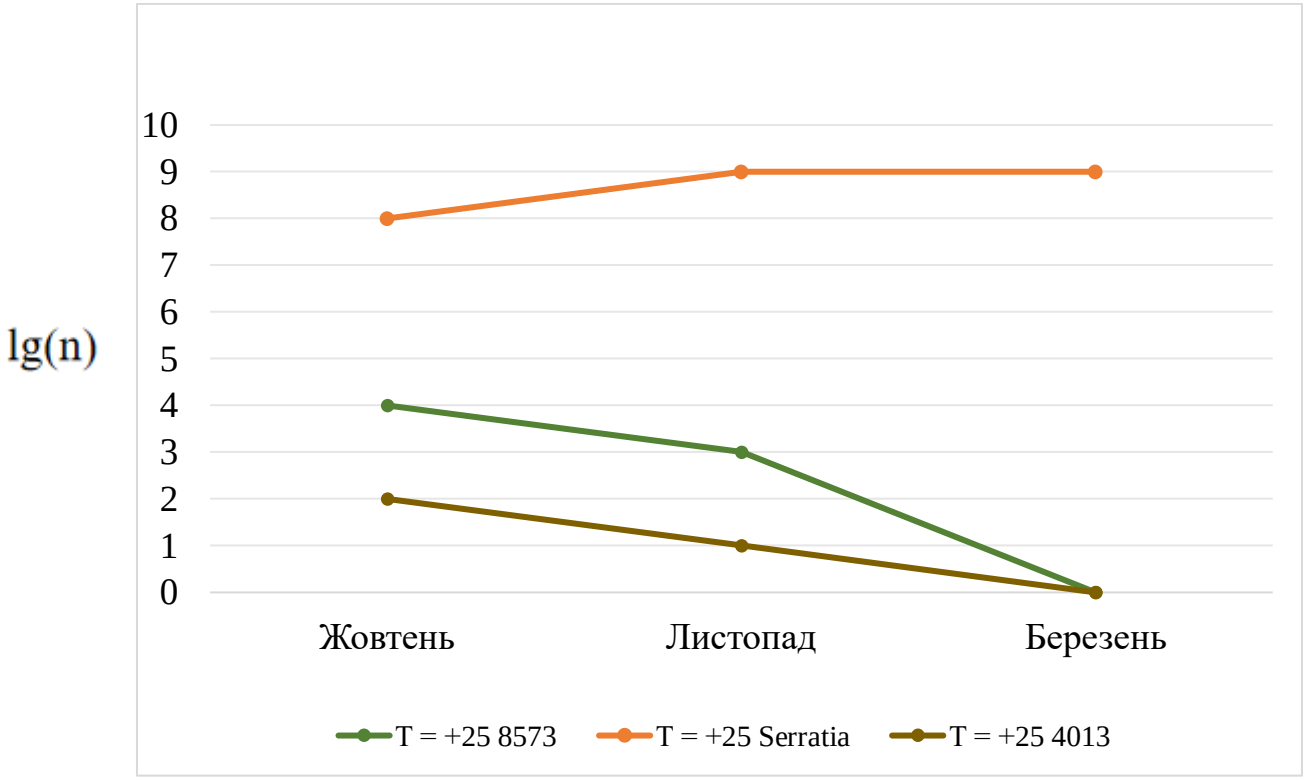


Рис. 3.9. Зміна інфекційної активності фагів при 25°C

Для більш наглядного порівняння особливостей збереження біологічної активності усіх бактеріофагів при всіх досліджуваних температурних режимах можна розглянути стовпчикову діаграму на рис. 3.9. Проаналізувавши отримані результати можна зауважити, що бактеріофаг 4013/M мав найбільше зниження біологічної активності з підвищенням температури, тоді як титр бактеріофагу 8573/M залишався достатньо стабільним протягом тривалого часу. Окрім того, фаг Serratia показує цікаву динаміку витривалості та збереження лізуючих властивостей незважаючи на діапазон температур, що робить його вигідним кандидатом для використання у фаготерапії. Лише один раз за період проведення експерименту ми змогли зафіксувати зниження титру

до 10^6, що є найвищим мінімальним показником серед всіх трьох бактеріофагів.

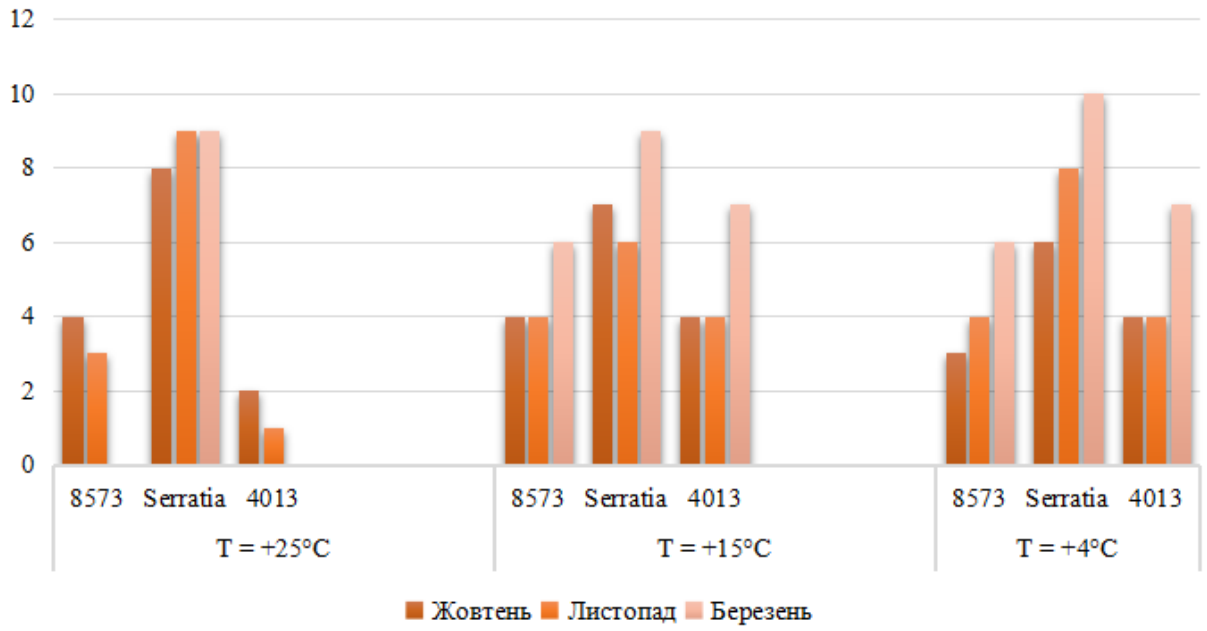


Рис. 3.10. Зміна інфекційної активності фагів при 4°C, 15°C та 25°C

Важливою на наш погляд є оцінка можливості збереження фаголізатів при екстремальних температурах. При температурі 25°C більшість фаголізатів виявилась лабільними. Зокрема, термін інактивації фагів 4013/M, 8573/B та 8573/M у фаголізатах становив шість місяців, тоді як для бактеріофагу *Serratia* 1 терміну інактивації не було зафіксовано. Окрім Ser/1, жоден з бактеріофагів не мав сталого стабільного титру довше одного місяця, після чого результати варіювали. При чому всі фаги, окрім Ser/1, показували дану стабільність при середній температурі 20°C, а Ser/1 лишався стабільним протягом п’яти місяців за максимальної досліджуваної температури 25°C**.** Проаналізувавши всі результати можна зробити висновок, що для даних бактеріофагів діапазон температури від 8 до 20°C є нормальним, однак починаючи з 25°C деякі є витривалішими. Зокрема, в даному дослідженні В даному дослідженні

бактеріофаг 4013/М мав найбільше зниження біологічної активності з підвищенням температури, тоді як титр бактеріофагу 8573/М залишався достатньо стабільним протягом тривалого часу. Окрім того, фаг *Serratia* показує цікаву динаміку витривалості та збереження лізуючих властивостей незважаючи на діапазон температур. втрата концентрації інфекційних одиниць вірусу в досліджуваній речовині була зареєстрована лише один раз для даного фагу (рис.3.11).

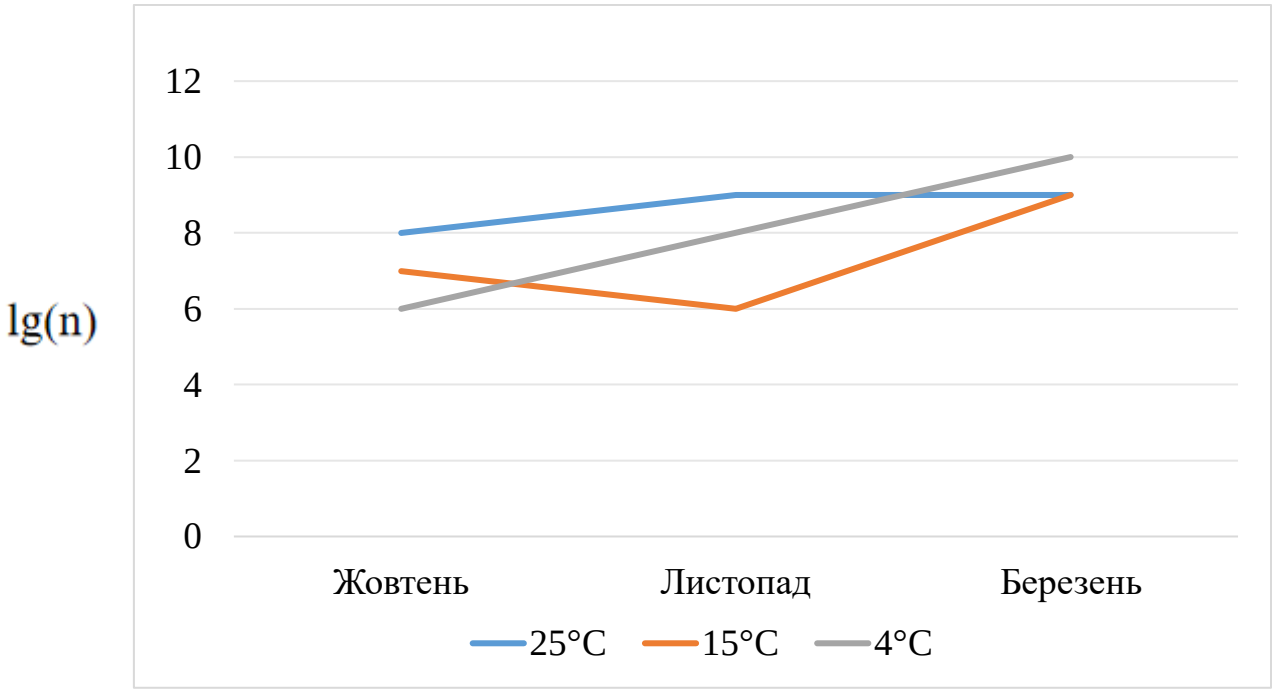


Рис. 3.10. Зміна біологічної активності Ser/1 протягом шести місяців

Таким чином, результати досліджень вказують на те, що для практичного використання препарату можна рекомендувати препарати фагів з максимально можливою концентрацією, але не нижче 10^6 БУО/мл, оскільки це мінімальна концентрація фагів, яка приводить до утворення зон лізису. Внесення вищевказаної концентрації фагів повинне забезпечити підвищення чисельності популяції фагів до концентрації 10^6 БУО/мл, яка призводить до

повного лізису чутливих бактерій. Також варто зауважити, що властивості адаптації до оточуючої температури потребують детальнішого вивчення принаймні для фагу *Serratia* 1, адже його збереження лізуючої активності незважаючи на температурний діапазон може визначати його як перспективного кандидата для практичного використання. Однак, зважаючи на різноманітність затверджених температурних режимів у догляді за овочевими та фруктовими культурами різних країн, можна також припустити, що інші бактеріофаги також можуть бути рекомендовані для використання.

ВИСНОВКИ

1. Виділено та охарактеризовано 4 ізоляти фагів Ser/1, 8573/B, 8573/M та 4013, які відрізнялись за розміром негативних колоній (2-4±0,5 мм).

2. За морфолого-структурною організацією ізолят фагу Ser/1 відносяться до сіфоподібних вірусів із розмірами: головки 87±2 нм, хвостового відростку 105±2 нм, а ізоляти фагів 8573/B - головка 80±2 нм, хвостовий відросток 17±1 нм, 8573/M головка розміром 65±2 нм та хвостовий відросток 9±3 нм, а ізолят фагу 4013/M хвостовий відросток розміром 10±3 нм та головка 72±3 нм - відносяться до подоподібних вірусів.

3. Визначено спектр літичної активності фагів відносно 7 штамів бактерій. Встановлено, що всі ізоляти фагів проявляли літичну активність до 5 штамів бактерій, є полівалентними.

4. Встановлено, що ізолят фагу Ser/1 є найбільш стабільним при його збереженні в умовах різних температурних діапазонів (+4°C, +15°C та +25°C) протягом шести місяців та є перспективним агентом для створення біологічного засобу захисту рослин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Muhsin, J., Sayed M. A. U. S. B., Saadia A., Muhammad A., Sana R., Muhammad A. N., Tahir H., Sadeeq u. R. and Syed S. A. S. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *The Journal of Basic Microbiology*, [online] Volume 59, p. 960. Available at: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.201970021 [Accessed 4 Dec. 2023].

2. Britannica (2018). *Bacteriophage.* [online] Available at: https://www.britannica.com/science/bacteriophage [Accessed 4 Dec. 2023].

3. Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S. and Jiao, W. (2019). A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *The Environment International Journal*, [online] Volume 129, p. 488–496. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412019305410 [Accessed 5 Dec. 2023].

4. Balogh, B., Jones, J., Iriarte, F. and Momol, M. (2010). Phage Therapy for Plant Disease Control. *The Current Pharmaceutical Biotechnology Journal*, [online] Volume 11(1), p. 48–57. Available at: http://www.eurekaselect.com/article/16059 [Accessed 5 Dec. 2023].

5. Xin, X.-F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2019). Pseudomonas syringae: what it takes to be a pathogen. *The Nature Reviews Microbiology Journal*, [online] Volume 16(5), p. 316–328. Available at: https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17 [Accessed 5 Dec. 2023].

6. Invasive Species Compendium (2020). *Pseudomonas syringae pv. actinidiae (bacterial canker of kiwifruit)*. [online] Available at: https://www.cabi.org/isc/datasheet/45002 [Accessed 5 Dec. 2023].

7. Ackermann, H. (2011). The first phage electron micrographs. *The Bacteriophage Journal*, [online] Volume 1(4), p. 225-227. Available at: https://doi.org/10.4161/bact.1.4.17280 [Accessed 6 Dec. 2023].

8. Kasman LM, Porter LD. (2022). Bacteriophage. *StatPearls Online Library*, [online]. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185 [Accessed 7 Dec. 2023].

9. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2022). *Taxonomy release history*. [online] Available at: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases [Accessed 7 Dec. 2023].

10. Turner, D., Kropinski, A. M. and Adriaenssens, E. M. (2021). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, [online] Volume 13(3), p. 506. Available at: https://doi.org/10.3390/v13030506 [Accessed 7 Dec. 2023].

11. Jamal, M., Bukhari, S. M. A. U. S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M. A. and Shah, S. S. A. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of Basic Microbiology*, [online]. Available at: doi:10.1002/jobm.201800412 [Accessed 8 Dec. 2023].

12. Healthline (2019). *What Is Phage Therapy?*. [online] Available at: https://www.healthline.com/health/phage-therapy [Accessed 8 Dec. 2023].

13. Pires, D., Ana Rita Costa, Graça Pinto, Luciana Meneses, Joana Azeredo, Current challenges and future opportunities of phage therapy, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 44, Issue 6, November 2020, Pages 684–700, https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa017 [Accessed 8 Dec. 2023].

14. Kering, K. K., Kibii, B. J. and Wei, H. (2019). Mini Review: Biocontrol of Phytobacteria with Bacteriophage Cocktails. *The Pest Management Science Journal*, [online]. Available at: doi:10.1002/ps.5324 [Accessed 9 Dec. 2022].

15. Balogh, B., Jones, J., Iriarte, F. and Momol, M. (2010). Phage Therapy for Plant Disease Control. *The Current Pharmaceutical Biotechnology Journal*, [online] Volume 11(1), p. 48–57. Available at: doi:10.2174/138920110790725302 [Accessed 9 Dec. 2023].

16. Richert-Pöggeler, K.R. (2019). Electron Microscopy Methods for Virus Diagnosis and High Resolution Analysis of Viruses. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 9. Available at:

https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.03255/full [Accessed 9 Dec. 2023].

17. Electron Microscopy Methods for Virus Diagnosis and High Resolution Analysis of Viruses / K. R. Richert-Pöggeler et al. *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 9. URL: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03255 (date of access: 28.04.2024).

18. Nazarov, P. A., Baleev, D. N., Ivanova, M. I., Sokolova, L. M. and Karakozova, M. V. (2020). Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection. *The Acta naturae Journal*, [online] Volume 12(3), p. 46–59. Available at: https://doi.org/10.32607/actanaturae.11026 [Accessed 10 Dec. 2022].

19. Kumari, S., Nagendran, K., Rai, A. B., Singh, B., Rao, G. P. and Bertaccini, A. (2019). Global Status of Phytoplasma Diseases in Vegetable Crops. *The Frontiers in Microbiology Journal*, [online] Volume 10. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01349 [Accessed 11 Dec. 2023].

20. Gorrochategui-Ortega, J., Muñoz-Colmenero, M., Kovačić, M. (2022). A short exposure to a semi-natural habitat alleviates the honey bee hive microbial imbalance caused by agricultural stress. *The Scientific Reports Journal*, [online] Volume 12. Available at: https://doi.org/10.1038/s41598-022-23287-6 [Accessed 11 Dec. 2023].

21. Baltrus, D. A., McCann, H. C. and Guttman, D. S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of Pseudomonas syringae: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *The Molecular plant pathology Journal*, 18(1), [online] Volume 18(1), p. 152–168. Available at: https://doi.org/10.1111/mpp.12506 [Accessed 11 Dec. 2023].

22. Botelho, J., Grosso, F., Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa - Mechanisms, epidemiology and evolution. *The Drug Resistance Updates Journal*, [online] Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31492517 [Accessed 12 Dec. 2023]

23. Queenan, AM., Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *The Clinical Microbiology Review Journal*, [online] Volume 440. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1932750 [Accessed 13 Dec. 2023]

24. Будзанівська, І. та Поліщук, В. (2009). *МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ до практикуму зі спецкурсу «Діагностика вірусних інфекцій».* Київ.

25. Mohammadali, M. and Nilsson, A. (2015). Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *The PLoS ONE Journal*, [online] Volume 10(3). Available at: 10.1371/journal.pone.0118557 [Accessed 12 Dec. 2023].

26. Ács, N., Gambino, M. and Brøndsted, L. (2020). Bacteriophage Enumeration and Detection Methods. *The Frontiers in microbiology Journal*, [online] Volume 11. Available at: https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.594868 [Accessed 12 Dec. 2023].

27. Український вірусологічний сайт (2015). *Детекція P. mirabilis та E. cloacae в томатах та перці і виділення їхніх бактеріофагів.* [online] Available at: https://virology.com.ua/?p=879 [Accessed 12 Dec. 2023].

28. Борисов, Л. Б. (1984). *Керівництво до лабораторних занять з мікробіології.* 2-ге вид. [Accessed 12 Dec. 2023].

29. Гулій О. І., Павлій С. А., Бунін В. Д., Коннова С. А. та Ігнатов О. В. (2014). Визначення спектра літичної активності бактеріофагів методом електрооптичного аналізу клітинних суспензій. *Живі та біокісні системи*, [online]. Available at: http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-3 [Accessed 12 Dec. 2023].

30. Манзенюк, О. Ю., Воложанцев, Н. В. та Світоч, Е. А. (1994). Ідентифікація бактерій Pseudomonas mallei за допомогою бактеріофагів Pseudomonas pseudomallei. Мікробіологія, 63(3), сс. 537-544. [Accessed 12 Dec. 2023].