

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Зав. кафедри професор Будзанівська І.Г.  
Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри  
від “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2023 р.

ВЛАСТИВОСТІ ФАГІВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ  
РОДУ *XANTHOMONAS*

Кваліфікаційна робота магістра  
денної форми навчання  
за спеціальністю 091 «Біологія»  
Горбань Марії Миколаївни

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

Оцінка захисту роботи

---

Робота виконана на базі ННЦ «Інститут біології та медицини» кафедри вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом к.б.н., доц. Андрійчук О. М.

Київ – 2023

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

ДНК — дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК — рибонуклеїнова кислота

БУО — бляшкоутворююча одиниця

АТФ — аденозинтрифосфат

УФ – ультрафіолет

ФВК – фосфорновольфрамова кислота

ЕМ – електронна мікроскопія

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
РОЗДІЛ 1 Бактеріофаги.....	6
1.1. Історія відкриття та застосування бактеріофагів .....	6
1.2. Характеристика вірусів мікроорганізмів.....	8
1.2.1. Хімічний склад бактеріофагів.....	10
1.2.2. Морфологія бактеріофагів.....	11
1.2.3. Життєвий цикл бактеріофагів.....	16
РОЗДІЛ 2 Характеристика бактерій роду <i>Xanthomonas beticola</i> .....	22
2.1. Загальна характеристика бактерій роду <i>Xanthomonas</i> .....	22
2.2. Альтернатива антибіотикам.....	23
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 3 Матеріали та методи досліджень.....	24
3.1. Джерела бактерій і фагів.....	24
3.2. Титрування по Грація.....	25
3.3. Спот-тест.....	25
3.4. Препаративне отримання бактеріофагів.....	26
3.5. Електронно-мікроскопічне дослідження морфології віріонів.....	27
3.6. Вивчення поліпептидного складу досліджуваних бактеріофагів.....	28
РОЗДІЛ 4 Результати та їх обговорення.....	30
4.1. Місце та методи виділення досліджуваних бактеріофагів.....	30
4.2. Порівняльна характеристика титрів бактеріофагів 7325/М і 7325/В.....	31
4.3. Спектр літичної активності фагів .....	31
4.4. Морфологія негативних колоній досліджуваних фагів.....	33
4.5. Електронномікроскопічне дослідження морфології бактеріофагів.....	35
4.6. Поліпептидний склад досліджуваних фагів .....	37
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	41

## ВСТУП

За останні півстоліття активного використання антибіотиків, бактерії стають все більш стійкими до їх дії, до того ж, стійкі мутанти, як правило, агресивніші [38].

В природних умовах відбувається формування локальних популяцій бактеріофагів. Спонтанні мутації та природний відбір сприяють виживанню фагів, зміни в яких адекватні змінам навколишнього середовища. В лабораторних умовах потомство однієї фагової частинки може складати мільйони і, таким чином, давати початок новим популяціям. Однак в природі їх репродукція та тривале виживання залежить від щільності хазяїна та фагів. В зв'язку з чим важливим питанням, є збереження генофонду популяцій фагів. Репродукція споріднених фагів часто відбувається лише на різних видах бактерій. В той же час фаги, що мають спільних бактерій - хазяїнів можуть бути повністю відмінними. Широкий спектр літичної активності фагів, на перший погляд, сприяв би збереженню їх популяцій природі. На практиці вони, в основному, є вузькоспецифічними. Наприклад, лише біля 0,2%, ізолятів фагів *Pseudomonas* мають широкий спектр біологічної активності.

Практичне значення дослідження адаптації, еволюції та виживання бактеріофагів в природі полягає у визначенні факторів, які впливають на чисельність фагів — природних антагоністів бактерій, в тому числі і патогенних. Це відкриває перспективи розробки прогностичної моделі, яка дозволила б, враховуючи ці фактори, запобігати поширенню бактеріальних інфекцій. Важливість такого завдання зумовлена, зокрема, впливом техногенних чинників, які можуть прискорювати еволюцію популяцій фагів та бактерій, дивергенцію їх ознак та приводити до змін в структурі екосистем.

Виживання, поширення та збереження генофонду популяцій фагів, залежить від захисних механізмів чутливих бактерій та від механізмів подолання створеного бар'єру фагами. Таке явище є характерним для багатьох груп бактеріофагів. Але різні обмеження мутаційних процесів роблять малоймовірними безкінечні цикли розвитку як бактеріальних захисних механізмів, так і пристосувань фагів, спрямованих на подолання захисту. Для розуміння процесів, що при цьому відбуваються, є важливим, за твердженням Стента, те, що співіснування в природі бактерій та їх фагів підтримується за рахунок тонкої мутаційної рівноваги, яка зберігає обох антагоністів від повного знищення [1].

Застосування фагів в екосистемах з метою регулюючого впливу на чисельність патогенної мікрофлори важливою задачею є їх максимальний вплив на певні збудники в природному середовищі. Враховуючи вищесказане можна говорити про важливість врахування процесів еволюції серед популяцій фагів у практичних розробках. Із задач, що ще потребують свого вирішення є утворення фагостійких штамів.

Метою наших досліджень було виділення із агроценозу ізолятів бактеріофагів, отримання їх стабільних ліній та проведення їх порівняльного аналізу. Такі дослідження з відбором та аналізом великої чисельності проб потребують розробки нових та адаптацію існуючих методів дослідження бактеріофагів.

# ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

## РОЗДІЛ 1 Бактеріофаги

### 1.1 Історія відкриття та застосування бактеріофагів

Із прадавніх часів була відома цілюща властивість вод Ганга і Юмни, що лікували холеру (*Vibrio Cholerae*) – річок Індії, яку в подальшому задокументував британський вчений Ернест Ханбурі Нанкін. Він припустив, що даний феномен пояснюється невідомою речовиною, яка фільтрується крізь дрібний порцеляновий фільтр і є лабільною до нагрівання.

Два роки потому російський вчений Гамалія помітив подібний ефект при роботі з *Bacillus subtilis*. Спостереження ряду інших науковців того часу пов'язані з феноменом бактеріофагу [29].

У 1915 році британський бактеріолог Фредерік Туорт вперше виділив перевивний інфекційний агент, який руйнував бактеріальні клітини. Оскільки автор проходив крізь бактеріальні фільтри й не зростав на поживних середовищах, одним із трьох припущень Туорта було те, що даний агент є вірусом. Але, з різних причин, серед яких фігурували фінансові труднощі й початок Першої Світової Війни, його робота перервалася. Після друку невеликої статті, що на два роки залишалася непоміченою, про його відкриття забули.

В 1917-му році канадо-французький вчений Фелікс Д'Ерель, працюючи у Пастерівському інституті (Париж), незалежно від Туорта “офіційно” перевідкрив бактеріофаги. Йому одразу ж повідомили про роботу Туорта, але Д'Ерель продовжував наполягати на незалежності шляху свого відкриття.

Власне Д'Ерель вважається “батьком” бактеріофагії. Саме він дав назву “новим” агентам, зливши воєдино слово *bacteria* з грецьким *phagein*

(пожирати) та розробив основні методи роботи з ними, якими користуються й у сьогодні. На відміну від Туорта, Д'Ерель не покинув роботи й почав активно досліджувати бактеріофаги, просуваючи в учених колах ідею про їх вірусну природу. Не зважаючи на сучасну очевидність даного питання, для багатьох учених того часу теорія вірусної природи бактеріофагів здавалася досить кумедною, в протипагу їй висувалося припущення, що фаг є ендогенним самоіндукуючим ферментом, який входить у склад бактеріальної клітини.

У 1934 році Нобелівський лауреат (1960 рік по фізіології та медицині) сер Френк Макфарлейн Бернет висловив думку: “Як не агностичні сучасні уявлення про природу бактеріофага, усі, кому довелося мати з ними справу, вважають фаги вірусоподібними агентами, що привносяться у клітину ззовні”, що мала поставити крапку у суперечці.

Майже одразу після відкриття, Д'Ерель застосував бактеріофаги для лікування дизентерії, що напевно стало першим в історії людства свідомим застосуванням протибактеріальних препаратів на фаговій основі.

Він проводив дослідження у Hôpital des Enfants-Malades в Парижі в 1919 році під клінічним наглядом професора Віктора Генрі Гутінеля, завідуючого педіатрією цього госпіталю. З метою підтвердити безпечність нового препарату Д'Ерель, Гутінель та ще кілька практикантів проковтнули його за день до пробного лікування дванадцятирічного хлопчика з гострою дизентерією (що викликається *Shigella dysenteriae* – серогрупа А – грам-негативні, споронеутворюючі, безджгутикові, факультативні анаероби, споріднені до *E.Coli*). Через декілька днів хлопчик повністю одужав.

Ефективність фагових препаратів була підтверджена досить швидко, коле ще три пацієнта, які були хворі на бактеріальну дизентерію, почали одужувати в перші 24 години після отримання разової дози препарату.

Тим не менш, результати цих досліджень не були негайно опубліковані, саме тому перша задокументована заява стосовно лікувальних

властивостей фагів з'явилася у 1921 році від Richard Bruynoghe та Joseph, що використовували бактеріофаги для боротьби зі шкірним стафілококком [47].

Д'Ерель тим не менш, використовуючи різні фагові препарати, вилікував тисячі людей від холери й бубонної чуми в Індії.

Як це не парадоксально, але розвитку фагових препаратів перешкодило вибухове розповсюдження й дослідження ефективних антибіотиків після відкриття пеніциліну Яном Флемінгом у 1929 році.

Проте фаготерапії приділяли більше уваги протягом останніх 50 років в Східній Європі та в республіках бувшого СРСР, зокрема в Грузії [47].

На сьогодні є два шляхи розвитку фаготерапії: так званий, західний, де використовуються переважно одиничні добре визначені фаги, що спеціально “виводяться” проти конкретного мікроорганізму, та східний, де використовуються фагові “коктейлі”. На даний момент немає жодних даних про побічні ефекти фагової терапії, хоча у вісімдесяти роки ХХ сторіччя близько двох тон препаратів на фаговій основі було випробувано на солдатах радянської армії. Єдиним ефектом цього випробовування стало зниження випадків захворювання на дизентерію у десять разів.

## 1.2 Характеристика вірусів мікроорганізмів

Бактеріофаги – це віруси, що уражують виключно бактеріальні клітини. На даний момент немає жодної відомої бактерії, яка не могла би бути ураженою бактеріофагом чи не несла би у своєму геномі профаг (інтегровану нуклеїнову кислоту фага) [31, 34]. Бактеріофаги відомі для усіх типів бактерій без виключення: від бактеріальних паразитів роду *Dellovibrios* і до порівняно крупних синьо-зелених водоростей.

Як і будь-які інші віруси, фаги є носіями усіх основних вірусних ознак, що якісно вирізняють їх із живої природи:

- наявність одного типу нуклеїнової кислоти (ДНК чи РНК).

- Відсутність власного білок-синтезуючого апарата
- Не спроможність до росту та розмноження на поживних середовищах.
- Диз'юнктивна (розрізнена) збірка віріонів.
- Здатність до кристалізації.

Бактеріофаги є зручними об'єктами для досліджень за рахунок швидкого накопичення інфекційного матеріалу та відносній простоті маніпуляцій із їх геномом.

Фаги, подібно всім іншим вірусам є абсолютними клітинними паразитами. Вони несуть інформацію, необхідну для власної репродукції і водночас не мають жодних власних енергосинтезуючих систем та білок синтезуючих механізмів. Фаги є найбільш численними на Землі. Їх можна знайти у всіх можливих еконішах, що зайняті їх господарями – бактеріями. Високий рівень специфічності, довгострокове зберігання, та можливість відносно швидко репродукуватися у чутливих господарях призводить до встановлення рівноваги між широким колом бактеріальних видів у будь-яких природних еконішах. При відсутності відповідних господарів багато фагів зберігають інфекційні властивості на протязі десятків років до тих пір поки не інактивуються під впливом умов навколишнього середовища.

Деякі фаги налічують лише декілька тисяч основ в своєму геномі, тоді як наприклад нуклеїнова кислота фагу G (найбільша серед секвенованих на теперішній час) складається з 480 000 пар основ – що порівняно з геномом звичайної бактерії, і при цьому не містить генів таких необхідних структур як рибосоми. Більш ніж 95% всіх описаних у літературі фагів відноситься до порядку *Caudovirales*. Їх віріони складаються по масі приблизно порівну з НК та білку, з ікосаедричними головками, зібраними з багатьох копій одного чи декількох структурних білків; кути звичайно представлені пентаметрами білку, решта поверхні віріону – гексамери. За відмінностями морфологічної будови хвостового відростку виділяють 3 основних родини: 60% фагів

відносяться до родини *Siphoviridae*, вони мають довгі гнучкі хвостові відростки, 25% — до *Myoviridae*, з подвійною оболонкою та скоротливим хвостовим відростком, та решта 15% — *Podoviridae* з коротким хвостовим відростком. Представники останньої родини можуть нести в складі головки віріону декілька ключових білків, які здатні формувати структуру подібну до гнучкого розкладного хвостового відростку відразу після перших етапів рецепторної взаємодії з чутливою бактеріальною клітиною [2].

### 1.2.1 Хімічний склад бактеріофагів

Перші хімічні аналізи одразу ж показали, що фаги складаються з білка, проте дуже скоро, була визначена наявність фосфору, що вказувало на другий компонент, який згодом ідентифікували, як нуклеїнову кислоту.

В 30-х роках ХХ сторіччя Мартін Шлезингер непрямыми методами достовірно визначив розміри й хімічний склад фагів, а також вивчив механізм прикріплення фага до клітини-хазяїна.

За допомогою фарбування за Фульгеном очищеного препарату фага він довів наявність ДНК у складі бактеріофагів.

В 1940-му завдяки інноваційній технології – електронного мікроскопіювання була отримана перша фотографія вірусної частки [49], що остаточно поставило крапку у суперечці з приводу природи бактеріофагів [27].

За елементним складом бактеріофаги є дуже близькими до усіх інших живих організмів, в тому числі й до бактерій (табл. 1.1).

Порівняльна характеристика елементного складу бактеріофагу Т4 і чутливої до нього бактерії *E.Coli* (у відсотках, %)

Об'єкт	C	H	N	P	S
Т4	42,3	7,4	13,9	5,22	0,4-1,8
Бактерія	48,9-51,3	6,8-7,6	6,3-13,8	1,3-3,7	0,4-1,8

Але за хімічним складом, як вже зазначалося, фаги складаються з білка й нуклеїнової кислоти (яка, згідно класичним уявленням про вірус, може бути тільки одного типу: РНК чи ДНК, одно- чи дволанцюговою [18]), фактично усі фаги є нуклеопротеїдами.

Так, бактеріофаг Т4 складається з 50-52% білків і 48-50% ДНК. Переважаюча більшість бактеріофагів не мають у своєму складі вуглеводнів та ліпідів. Проте, відомі виключення, наприклад, бактеріофаги *AP50* [23], *PR4* [41].

До цікавих (з точки зору молекулярної біології) особливостей нуклеїнових кислот бактеріофагів можна віднести наявність нетипових азотистих основ, наприклад, у Т-парних фагах повністю відсутній цитозин (С), його роль виконує оксиметилцитозин (ОМ-С) (що певно робить Т4 виключно вірулентним фагом), наявність інтронних послідовностей (які не спостерігаються лише у бактерій) [1, 31].

До складу фагових білків входять амінокислоти L-ряду, співвідношення яких є близьким до такого у білках тварин, рослин, бактерій. Ізоелектрична точка капсидних білків фагів лежить переважно в кислому рН.

### 1.2.2 Морфологія фагів

У 1940 році, після перших спроб електронного мікроскопіювання бактеріофагів, був відмічений широкий спектр їх морфотипів [37].

В 1967 році Бредлі підсумував існуючі принципи морфології бактеріофагів та виділив основні морфологічні типи, що й досі є дійсними: шість груп (від А до F за англ. абеткою), представлено на рис. 1.1.

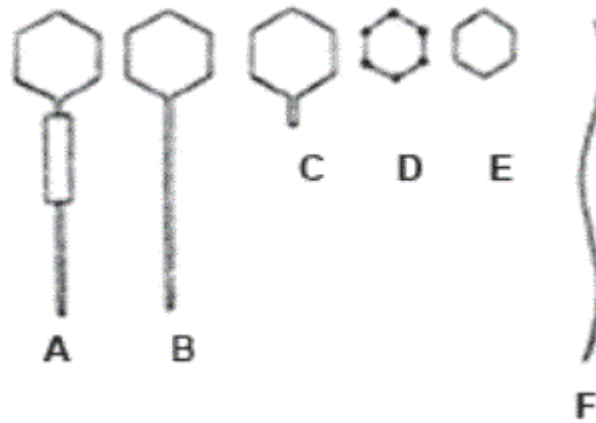


Рис. 1.1 Основні морфологічні типи бактеріофагів, Бредлі (1967):

А) Мають головку й довгий відросток, чохол якого здатен до скорочування.

В) Мають головку й довгий відросток, чохол якого не здатен до скорочування.

С) Складаються з головки й досить короткого відростка.

Д) Складаються з однієї головки, що має декілька виступів.

Е) Складаються з однієї головки без відростка.

Ф) Паличковидні та нитчасті [20].

Фаги інфікують *Eubacteria* та *Archaea*, таким чином їх і визначають як віруси прокаріот. Вони уражують більш ніж 140 родин бактерій, що включають: аероби та анаероби, екзоспоро- та ендоспороутворюючі, ціанобактерії, спірохети, мікоплазми, хламідії, екстремальні галофіти та метаногени, гіпертермофільні архебактерії, що ростуть при 100°C. Фаги відрізняються між собою морфологією (паличкоподібні, сферичні, лимоноподібні чи плеоморфні); можуть мати ліпідвмісну оболонку чи ні; геном представлений дво-, однопітковою РНК або ДНК, сегментованою або

ні; вихід з клітини відбувається літичним шляхом або ж фаги є лізогенними. T7-подібні коліфаги були знайдені також у симбіонтів парамецій та комах. Представники групи *Archaea* мають „своїх” власних фагів, які часто ще називають „архіфагами”. Деякі з них мають незвичайні, плеоморфні віріони. Як архіфаги, так і фаги, виділені з екстремальних умов, є ще не достатньо добре описаними. Повідомлення про хвостаті фаги, знайдені у еукаріотичній зеленій водорості *Chlorella*, не були підтверджені та очевидно описували випадки лабораторної контамінації [25].

Переважає більшість відомих на даний момент бактеріофагів (~96%) належать до групи В [19, 21]. Відомі й “незвичні” форми, наприклад бактеріофаги бактерій роду *Archaea* можуть мати форму краплі (*SNDV*), пляшки (*ABV*) або мати специфічні утворення – “кліщі” на терміналях (*AFV2*).

Фаги з хвостовим відростком представляють найбільш чисельну та розповсюджену групу (щонайменше 4950 фагів). Припускають що вони найдавніші серед вірусів, і утворилися близько 3,5 білліонів років тому – так датуються найдревніші знайдені мікробні скам’янілості [27]. Їх типові представники інфікують як *Eubacteria* так і *Archaea*, що може свідчити про те, що їх поява відбулася раніше ніж розділення бактеріальних царств [28, 29]. Віріони складаються лише з білкової оболонки та лінійної дволанцюгової ДНК, не мають додаткових оболонок, симетрія „бінарна”, тобто головки мають кубічний тип симетрії, а хвостові відростки – спіральний. Головки звичайні ікосаедри (85% фагів), або продовгуваті. Капсидний білок організований у капсомери (по 5-6 білкових субодиниць), проте капсомери важко детально проглядаються при електронній мікроскопії, тому поверхня головки здається гладенькою. Хвостові відростки є типовими спіралями або ж складаються зі стопки дисків. Вони як правило несуть структури, відповідальні за термінальну адсорбцію (базальну пластинку, шипи, фібри). Хвостоподібні структури мають деякі інші фаги (тектівіруси), проте вони є

дуже нестійкими та їх легко можна відрізнити від справжніх хвостових відростків [25].

ДНК хвостатих фагів за складом є подібною до клітинної, виняток становлять деякі фаги (Т7), що містять незвичайні основи, такі як 5-гідроксиметилцитозин. Геноми фагів є досить складними та як правило організовані в так звані „модулі”. Наприклад геном одного з найбільших фагів – *Bacillus phage G* складається з 498 т.п.н. і налічує 684 гени, що навіть більше ніж геноми деяких мікоплазм [30]. Як правило, гени, що виконують одні функції, кластеризовані. ДНК, що реплікується, формує складні структури, що називаються „конкатимери”, які як правило є більші за розміром ніж один геном фагу. З конкатимеру ДНК нарізається на фіксовану довжину та транспортується в попередньо сформовані білкові капсиди. Віріони складаються через окрему збірку своїх складових структур. Представники порядку можуть бути як вірулентними так і лізогенними. Помірні фаги складають більш ніж 50% та здатні надавати своїм господарям нових властивостей за рахунок явища, яке називають „лізогенною конверсією”. Їх геноми перебувають в клітині інтегруючись з хромосомною ДНК або ж у плазмідному стані.

Шкідливість від фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, які вражають бобові та інші важливі технічні культури побудила дослідників до вивчення цієї групи організмів, а також вірусів, які лізують ці бактерії. Фаги, активні проти фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, характеризуються високою специфічністю взаємодій з бактеріальною клітиною. Вони можуть широко використовуватися для ранньої діагностики бактеріальних інфекцій в природних умовах, коли збудника важко виділити. Підвищений інтерес до вивчення вірусів фітопатогенних бактерій визначається також суттєвою роллю самих мікроорганізмів в процесі виробництва активних речовин. Адже більшість промислових культур, якщо не всі вони, є лізогенними. Постійна присутність фагів в лізогенних культурах може наносити велику шкоду

виробництву і тому при розробці теоретичних і практичних заходів по боротьбі з фаголізисом особливу увагу потрібно приділяти всебічному дослідженню властивостей як вірулентних так і помірних фагів [16, 17].

Бактеріофаги характеризуються особливими властивостями, викликаючи лізис, як правило, гомологічних бактерій і дають при цьому стерильні бляшки (негативні колонії) чіткої, визначеної морфології і відповідного розміру. В залежності від самого фагу діапазон літичної дії може бути вузьким або ширшим. Так, деякі фаги можуть лізувати бактерії, які відносяться до декількох родів або навіть родин, інші, навпаки, уражають лише окремі види бактерій або навіть окремі штами (фаготипи). Морфологія негативних колоній слугує однією із розпізнавальних ознак при класифікації фагів. В деяких випадках ця ознака дуже характерна і корелює з іншими властивостями вірусу [18]. Самойленко В.І., досліджуючи фаги фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* повідомляє, що хоча вони утворюють різні негативні колонії, все ж володіють однаковою здатністю лізувати бактерії роду *Pseudomonas* [19].

При диференціації фагів по формі негативних колоній необхідно враховувати варіабельність цієї ознаки і її залежність від якості середовища. На агарі різної концентрації один і той же фаг буде давати колонії, які відрізнятимуться по формі колонії. Крім того, необхідно враховувати, що морфологія колонії фагу змінюється на протязі їх формування. Тому аналіз морфології колонії бактеріофага потрібно проводити відразу після їх формування.

Враховуючи все вище описане, можна відмітити, що морфологія негативних колоній фагу не є основним критерієм диференціації бактеріофага. Разом з цим критерієм для класифікації бактеріофагів використовуються серологічні і антигенні властивості фагів.

Різні типи фагів мають неоднакові антигени, так як і антитіла, які виникають в результаті імунізації одним типом фагу, майже завжди не здатні

нейтралізувати інфекційність іншого типу. Інколи, правда є винятки, коли антисироватка, отримана в результаті імунізації одним типом фагу, може нейтралізувати частинки іншого виду. Ці види мають спільні антигени і є антигенноспорідненні. Саме постановка перехресних реакцій нейтралізації дала можливість дослідникам встановити достовірну спорідненість між фагами і виявилась більш надійним методом, ніж порівняння спектрів літичної дії або морфологія негативних колоній [20].

Аналіз літературних даних по вивченню біологічних властивостей фагів фітопатогенних бактерій показав, що досліджувані фаги можуть виявляти видову специфічність по відношенню до культур роду *Pseudomonas*, штамову специфічність і полівалентність, тобто лізувати різні бактерії.

### 1.2.3 Життєвий цикл фагів

Життєвий цикл бактеріофагів (на прикладі бактеріофагу T4) можна поділити на такі стадії:

- Обернене прикріплення фібрил фагу до рецепторів бактеріальної клітини. На цій стадії фаг легко може від'єднатися від клітини.
- Необернене прикріплення, коли від'єднання фага стає неможливим (T4 приєднується лише до глікозилу 1,3-ліпополісахариду мембрани чи до OmpC зовнішнього мембранного білку *E. coli*).

Перші дві фази називаються адсорбцією фагу – до 1 хв.

- 0-2 хв. Проникнення (ін'єкція) нуклеїнової кислоти в мікробну клітину, пригнічення бактеріального білкового синтезу та початок транскрипції (синтез ранньої мРНК).
- 3 хв - початок деградації клітинної ДНК.
- 5 хв - Ініціація синтезу фагової ДНК.
- 9 хв - синтез пізньої мРНК.

- 12 хв - поява головок та хвостів.
- 15 хв - поява перших сформованих фагових частинок.

Останні шість стадій називаються екліпс-фазою (внутрішньоклітинне розмноження фага) – це часовий проміжок від зараження й до появи всередині клітин перших інфекційних фагових частинок.

- 22 хв - лізис клітини й вихід із неї нових фагових часточок, здатних до подальшого ураження сусідніх клітин [6].

Проте, є випадки, коли новоутворені часточки не руйнують клітину, а проходять крізь її клітинну стінку, наприклад, нитчасті фаги.

В "host-rich" середовищі, коли воно є багатим на чутливу бактеріальну культуру, для фага є вигідним скорочення власного інфекційного циклу і, як наслідок, зменшення кількості новоутворених інфекційних частинок, оскільки в такому випадку нащадки можуть ефективніше проводити нові інфекції, підтримуючи при цьому експоненціальне зростання своєї чисельності.

І навпаки, в "host-deficient" середовищі, коли воно є бідним на чутливу бактеріальну культуру – подовження інфекційного циклу дозволяє збільшити кількість нащадків (що є очевидною перевагою, оскільки збільшується ймовірність зустрічі інфекційної частинки із клітиною-господарем) й розпочати нову інфекцію.

Таким чином, за мільярди років було відібрано найбільш непохитну систему лізису бактеріофагами, аби протистояти еволюційному тиску [28].

В результаті, усі відомі на даний момент дволанцюгові ДНК фаги (хвостаті) використовують двокомпонентну холінендолізін систему, щоб досягти регульованого, програмованого лізису.

Лізис бактерії бактеріофагом залучає принаймні дві фундаментально різні стратегії. Більшість фагів мають хоча б два протеїни, один з яких – муреїн-гідролаза чи лізін, а другий – мембранний протеїн, холін – функція якого полягає у пошкодженні цитоплазматичної мембрани. Крізь утворене

пошкодження муреїн-гідролаза отримує допуск до клітинної стінки з подальшим руйнуванням останньої, ця подія має назву “hole formation”.

Приведений процес є важливим, оскільки вірус-індукований лізоцим не має секреторного сигналу, щоби самостійно вийти за межі цитоплазми (це добре спостерігається на прикладі T-парних фагів, пізні гени яких власне й кодують лізоцим, а продукт гену t пошкоджує цитоплазматичну мембрану) [40].

Хоча природа пошкодження не є достатньо вивченою, проте саме білок холін контролює час, коли клітина повинна бути лізована.

Нормальна швидкість лізису бактеріальних клітин бактеріофагом  $\lambda$  становить близько 50 хвилин (за стандартних лабораторних умов: +37°C, з аерацією). Дослідниками були створені missense мутанти по гену S (що кодує 105S холін), але при неушкодженому гені R (що кодує так званий  $\lambda$  лізоцим). Було показано, що час лізису бактеріальних клітин, уражених такими фагами коливався від 12 хвилин до 2 годин, що переконливо свідчить про генетичну детермінованість цього процесу за рахунок дії холіну.

Окрім холіну, продуктом гену S є антихолін, котрий пригнічуючи дію першого регулює час лізису [32].

Друга стратегія використовується маленьким одноланцюговим ДНК фагом Ф X174 та одноланцюговим РНК фагом MS2, в циклі розвитку яких не спостерігається жодного синтезу муреїн-гідролази. Замість цього використовуються малі мембранні протеїни, які працюють в якості активаторів клітинного автолізу.

Середня кількість фагових часточок, що вийшли з однієї клітини під час її лізису, називається виходом фага. Приблизний вихід бактеріофага T4 складає 100 одиниць на одну клітину [40], для більшості РНК-фагів цей показник коливається від 1000 до 10000 фагових частинок, що ймовірно може бути використано для створення ефективних антибактеріальних препаратів [28].

Для того, щоби вивчити послідовність подій при одиничному циклі репродукції фага, був розроблений спеціальний (нині класичний) метод, що отримав назву одиничного циклу репродукції, представлений на рис. 1.2 [3].

Його суть полягає у наступному:

- Концентровану центрифугуванням суспензію бактеріальної культури змішують із фагом.
- Для адсорбції фага на бактеріальній клітині суміш інкубують, причому час інкубації не повинен перевищувати час мінімального латентного періоду (2хв).
- Отриману суміш сильно розводять у 10000 разів свіжим поживним середовищем.
- Через певні інтервали часу із суміші відбирають проби та висівають їх на чашки, підраховуючи кількість утворених стерильних бляшок.

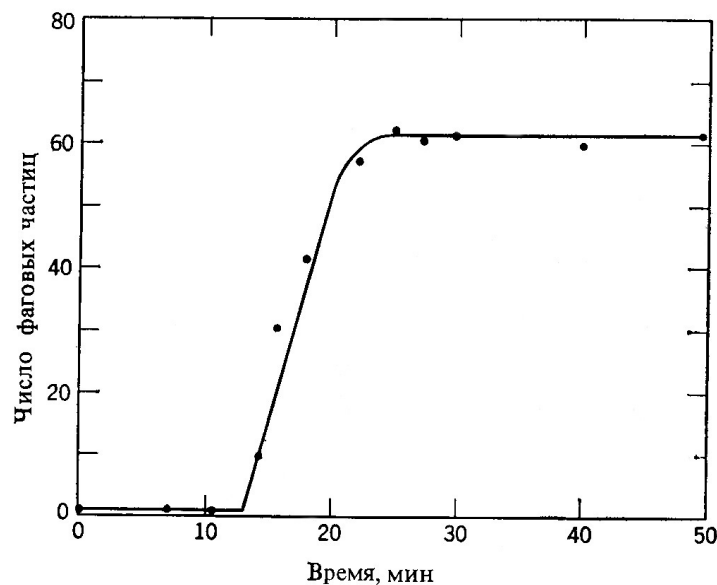


Рис. 1.2. Метод одиничного циклу репродукції бактеріофага [3]

Описаний тип розвитку є літичним, існує ще лізогенний - коли геном фага вбудовується в геном бактерії (чи існує у вигляді плазміди). Класичним

прикладом лізогенного типу розвитку бактеріофага є модельна система: бактеріофаг  $\lambda$  – бактерія *E. coli*.

Ще до експериментів Андре Львова було помічено, що при ураженні бактерій фагом частина клітин не руйнується, переживає інфекцію і дає початок колоніям лізогенних бактерій - носіїв профагу. Львов описав штам *E. coli*, при опроміненні якого помірною дозою ультрафіолету клітини припиняють свій ріст і приблизно через 90 хвилин руйнуються, вивільнюючи в зовнішнє середовище велику кількість фагових частинок, які, у подальшому, і назвали бактеріофагом  $\lambda$ . Виділений фаг можна знову висіяти на чутливій до нього *E. coli*, але поряд із лізованими бактеріями будуть й ті, що нестимуть у своєму геномі геном фагу  $\lambda$ , тобто будуть лізогенізованими. Такі бактерії нормально ростуть і розмножуються, допоки знову не будуть опромінені УФ. Фаги, що можуть існувати у вигляді профагу, називаються помірними. На противагу цьому, є виключно вірулентні фаги (наприклад T4), що за будь-яких умов не можуть існувати у вигляді профага.

#### 1.2.4 Екологія бактеріофагів

Бактеріофаги поширені в усіх екосистемах, де поширені бактерії. Еволюційний підхід дозволяє розглядати їх під впливом природного середовища, де важливим є як титр фагів у екосистемі, так і щільність бактеріальної популяції і фізіологічний стан мікроорганізмів [17].

Дослідження взаємодії у системі популяцій фагів і бактерій в умовах природного оточуючого середовища дає можливість досліджувати динаміку процесу взаємодії і розвитку популяцій, а також її зв'язок з факторами оточуючого середовища, що дає більш повну уяву про бактеріофаги.

Відношення кількості вірусних часток до кількості бактерій складає в середньому 10:1. Більше того, існують дані, що дають підстави вважати бактеріофаги найчисленнішими організмами на Землі з популяцією, що

перевищує  $10^{30}$  вірусних часток [50]. Враховуючи таку чисельність, навіть малоймовірні події, спричинені фагами, такі як трансдукція, відбуваються досить часто. Причому чисельність вірусних часток полягає не лише у величезній їх кількості, а й у досить значному видовому різноманітті [24, 35].

Висока концентрація вірусних часток спостерігається у мулі, ґрунті, травному тракті тварин, особливо жуйних, кишечник яких містить високі концентрації бактерій, у екскрементах людини і тварин, у їжі, виготовленій промисловим чином. Бактеріофаги спричиняють економічні втрати на харчових підприємствах, цикл виробництва яких пов'язаний з бактеріальним бродінням.

В природі титр фагів коливається відповідно до умов, що впливають на життєдіяльність бактерій. У морських екосистемах кількість фагів залежить від інтенсивності сонячного ультрафіолетового випромінювання і зовнішніх умов — найвища концентрація фагових часток досягається за умов, оптимальних для відтворення бактеріального планктону. Подібні явища також спостерігаються у ґрунті [2], на молокозаводах та у кишечнику людини і тварин тощо.

Відмінність природних умов від лабораторних для бактеріофагів полягає ще й у тому, що у природному середовищі при високій концентрації бактерій на кубічний мілілітр у цьому об'ємі можуть домінувати бактерії, до яких даний фаг не є специфічним. Наприклад, для морської води прибережної смуги розрахована концентрація бактерій, за якої репродукція фагу залишається можливою, проте фаги зберігають чисельність популяції за значно менших концентрацій бактерій-хазяїв [39, 50].

Одним з розв'язань цієї проблеми для фагу є полівалентність. Вона зустрічається в основному у ціанофагів.

Водночас для лабораторних фагів встановлена досить вузька видова специфічність, характерна і для великої кількості природних штамів.

## РОЗДІЛ 2 ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ РОДУ *XANTHOMONAS*

### 2.1 Загальна характеристика бактерій роду *Xanthomonas*

Існує велика кількість бактерій, шкідливих для продуктів людської діяльності й для людини зокрема, до них відносяться й фітопатогенні бактерії, що наносять значну шкоду врожаю.

Здебільшого до таких бактерій відносять представників групи Протеобактерії (Proteobacteria), а саме – гамма-протеобактерії (Gamma Proteobacteria).

Значну питому вагу фітопатогенів серед Gamma Proteobacteria складають представники родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas* та *Erwinia*, які є збудниками захворювань багатьох сільськогосподарських рослин [10, 11].

*Pseudomonas* — грам-негативні, паличковидні аеробні бактерії. Більшість мають джгутики. Можуть виробляти слиз.

Здатність *Pseudomonas* процвітати в жорстких умовах — результат структури їх клітинної стінки, яка містить порини. Їх опір більшості антибіотиків приписується так званим АВС-транспортерам, що “викачують” антибіотики до того, як ті встигають подіяти. Бактерії цього роду наносять значний збиток сільському господарству, оскільки викликають м’яку гниль цукрового буряку та бактеріоз пшениці [16, 44].

Найбільш розповсюдженим фітопатогеном серед *Erwinia* є:

*Erwinia carotovora* – грам-негативна бактерія, що споріднена із *E.coli*, *Shigella*, *Salmonella* та *Yersinia*. Цей фітопатоген має широке коло господарів (морква, картопля, помідори тощо) й може викликати захворювання в більшості рослинних тканин, що їх уражує (м’яка гниль). Тому *Erwinia carotovora* дуже важливий економічний патоген, що відповідає за втрати врожаю після його збору та гниття фруктів, що лежать на продаж. До вірулентних (кількісний вираз патогенності даного штаму інфекційного

агента) факторів відносять: пектинази, целюлази, протеази, ліпази, ксилінази й нуклеази [42].

*Xanthomonas* – грам-негативні аеробні паличковиді бактерії з полярними джгутіками. На поживних середовищах формують випуклі колонії жовтого кольору з великою кількістю слизу. Бактерії роду *Xanthomonas* також уражують широке коло господарів, серед яких: цитрусові, квасоля, виноград, бавовна, рис та цукрові буряки (буряки є критично важливою культурою для сільського господарства України) [5, 43].

## 2.2 Альтернатива антибіотикам

Як вже зазначалося вище, більшість бактерій або мають захист проти антибіотиків (помпа) або пристосовуються (стають нечутливі) до нього [30].

В наш час можуть бути розглянуті три принципово різні шляхи подолання цієї проблеми:

- Застосування комплексної фаготерапії.
- Використання бактеріолітичних ферментів мікробного й вірусного походження.
- Застосування принципово нових антибіотиків – пептаболів.

Пептаболи - продукти не рибосомальної білок синтетази (NRPS) – лінійні пептиди, антибіотики, виробляються грибами роду *Trichoderma* й грибами інших родів.

Так, наприклад, у огірків вирощених разом із *Trichoderma virens*, у якого порушений ген *tex1* (що кодує NRPS) значно знижений опір проти дії фітопатогена *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*. В той час, як в контрольній групі цього не спостерігалось [25, 33].

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

## РОЗДІЛ 3 Матеріали та методи досліджень

### 3.1 Джерела бактерій і фагів

В роботі використовували індикаторну культуру фітопатогенної бактерії, що була отримана з колекції музею Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, відділу фітопатогенних бактерій (штам: *X. axonopodis pv. beticola* 7325).

Часто виявлені в досліджуваних зразках бактеріофаги являють собою суміш фагів. Тому проводять виділення “чистої лінії” досліджуваного фага, з подальшим пасуванням його на чутливій бактерії [9]. Чисті лінії бактеріофагів отримували шляхом шестикратного пасування з використанням методом виколювання окремих негативних колоній. Отримані ізоляти фагів використовували надалі для напрацювання їх в препаративних концентраціях та об'ємах.

Для вирощування бактерій та титрування фагів використовували готові комерційні агаризовані поживні середовища, на основі рибного гідролізату.

Розведення фагів проводили на 0,9 % розчині NaCl (фізіологічний розчин) або комерційному м'ясному бульйоні, приготовленому згідно інструкції підприємства-виробника. Титр визначали по Грація та методом spot-test в бляшкоутворюючих одиницях на мл (БУО/ мл).

### 3.2 Титрування по Грація

Висівання методом по Грація – метод титрування фага, 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, термостатуванням і підрахунком кількості негативних колоній [6].

При титруванні методом по Грація використовували розведення вірусомісного матеріалу у фізіологічному розчині. Роботи проводилися у стерильних умовах. Пробірки та чашки підписувалися, відповідно до розведення вірусу.

У 0,7% поживне агаризоване середовище додавали змив бактеріальної культури (0,4 мл), 1 мл вірусомісного матеріалу відповідного розведення і виливали на чашку з 1,5% поживним агаризованим середовищем. Чашки ставили у термостат на 12 год.

Визначення титру по Грація 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.

### 3.3 Спот-тест

Титрування методом spot-test дозволяє визначити титр фагу на одній бактеріальній культурі, використовуючи лише одну чашку з культурою, що прискорює дослідження. Для цього послідовно робили розведення вірусомісного матеріалу у плашці, на чашку з культурою наносили сітку, позначали клітинки цифрами, що відповідали ступеню розведення

вірусомісного матеріалу. Після нанесення 5 мкл матеріалу за допомогою автоматичних дозаторів, чашки ставили у термостат з температурою 25°C на 12 годин для досягнення оптимальних умов росту бактеріальної культури. За титр вірусу приймали останнє розведення, яке викликало утворення негативних колоній на бактеріальній культурі.

### **3.4 Препаративне отримання бактеріофагів**

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

З метою їх, одержання використовували такі методи:

- Накопичення лізатів шляхом отримання зливного лізису негативних колоній фагів на чашках Петрі [9].
- 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. Чашки з вирощеними тест-газонами заливали на ніч 5 мл стерильного фізіологічного розчину та зберігали в холодильнику при 4°C.

Наступного дня зливали з чашок фізіологічний розчин з екстрагованими фаговими частинками.

Другий метод складався з інкубації бактерій та фагів, що їх лізують при температурі 25°C на комерційному поживному бульйоні або гідролізаті лактальбуміну. Усі процедури проводили у спеціальній колбі, до якої під'єднана скляна трубка зі стерильним ватним фільтром для аерації. Подачу повітря виконували за допомогою компресору. Завдяки аерації культура скоріше переходить у log – фазу, а урожай фагів вищий. Фаг вносили з множинною інфекцією 1:10. Про досягнення моменту лізису судили за

інтенсивним піноутворенням, яке в цей час різко збільшувалось, клітинні уламки осідали на дно колби, бульйон світлішає. Після чого аерацію припиняли. Лізати звільняли від зруйнованих бактеріальних клітин. До фаголізату додавали хлороформ. Інфекційний титр фагів складав  $10^8 - 10^9$  БУО/мл.

Для освітлення фаголізатів використовували центрифугування при 5000g протягом 30 хвилин. Проводили подальшу концентрацію і очищення фагу з лізату.

### **3.5 Електронномікроскопічне дослідження морфології віріонів**

Для виготовлення плівок застосовували 0,1–0,2%-ний розчин формвара (полівінілформальдегіда). Як розчинник використовували хлороформ. Розчин готувати за добу до використання.

Предметне скло швидко занурювали в розчин формвару, через 5 – 10 сек виймали й просушували. Отриману плівку підрізали лезом, знімали плівку на воду, повільно занурюючи у воду під кутом  $45^\circ$ . На плівку викладали сітки і знімали їх за допомогою фільтрувального паперу. Сітки з плівкою висушували і зберігали в чашках Петрі. Електронномікроскопічні дослідження проводили на мікроскопі EM-125 при напрузі 60 кіловольт та інструментальному збільшенні 30000.

Для виготовлення електронномікроскопічних препаратів віріонів на сітку з формваровою плівкою-підкладкою наносили краплю вірусомісного матеріалу, витримували 2-3 хв, надлишок видаляли фільтрувальним папером. Контрастування здійснювали 2% розчином ураніацетату, рН 5,6 [9].

Фотографували на пластинки ЯМР – 1. За розміри фагових голівок приймали відстань між протилежними вершинами.

### 3.6 Вивчення поліпептидного складу досліджуваних бактеріофагів

Вивчення поліпептидного складу фагових віріонів проводили у поліакриламідному гелі (ПААГ) за методом диск-електрофорезу (по Леммлі) [36]. Суть методу полягає у використанні двох гелів: розділяючого 12% поліакриламідного гелю та 5% концентруючого гелю.

Готували 12% розділяючий гель: дистильована вода – 6,7 мл, Тріс-НСІ рН 8,8 – 5 мл, 10%-й SDS – 200 мкл, ПАА (акриламід та бісакриламід) – 8 мл, 10% персульфат амонію – 100 мкл, TEMED – 10 мкл.

5% стартовий (концентруючий) гель: дистильована вода – 4,5 мл, Тріс-НСІ рН 6,8 – 1,85 мл, 10%-й SDS – 75 мкл, ПАА (акриламід та бісакриламід) – 0,9 мл, 10% персульфат амонію – 37,5 мкл, TEMED – 7,5 мкл.

Гелі відрізняються по рН, молярності, концентрації. На стартовий гель наносили зразки, які доходили до розділяючого гелю, де концентрувалися і йшли рівним фронтом. Щоб в гелі було видно знаходження білків, вносили лідируючий барвник, який повинен бути легшим за зразки.

Для обробки гелів після електрофорезу використовували:

- а) для фіксації та консервування: етиловий спирт – льодяну оцтову кислоту – воду у співвідношенні 5:1:5;
- б) для забарвлення: 0,1%-й розчин Coomassie Brilliant Blue – R 250 (“Serva, Німеччина) у розчині для фіксації та консервування;
- в) для відмивки: 7% водний розчин оцтової кислоти.

Гелі формували між парою скляних пластинок у спеціальному штативі. Спочатку вносили мономери розділяючого гелю. Для пластинок висотою 12 см їх заливали на 2 см нижче верхнього зрізу. Для рівномірної полімеризації на поверхню нашаровували над гелем воду. Після полімеризації вставляли гребінку та вносили мономери стартового гелю. Після полімеризації гребінку акуратно видаляли.

Після того як вставляли утворений гель та зафіксували між скляними пластинами в прилад для електрофорезу, наливали в камеру електрофорезний буфер. Рівень буферу був на 2 мм вище кiраю скляної пластинки.

Досліджуваний зразок бактеріофагу розводили у буфері зразку у співвідношенні 3:1. Розведення робиться для того, щоб підібрати належну концентрацію досліджуваного зразка. Перед нанесенням на гель зразки інкубували на водяній бані при 100° С протягом 3 хвилин, швидко охолоджували та вносили в лунки гелю.

Перший етап: до входження лідуєчого барвника в розділяючий гель – напруга джерела струму 60-80 V.

Другий етап: напруга джерела струму в розділяючому буфері – 180 - 200 V.

Коли лідуєчий барвник сягав нижнього зрізу скляних пластинок, електрофорез вважали закінченим.

Після закінчення електрофорезу розділяючий гель переносили у розчин для фіксації та фарбування.

Фарбування проводили до забарвлення гелю рівномірним насиченим синім кольором. Гелі відмивали в 7% водному розчині оцтової кислоти 5-6 разів при температурі 37° С до повної прозорості гелю [8].

Ще однією необхідною умовою для визначення молекулярних мас є використання стандартних маркерів. Використовували маркери до складу яких входять білки з відомою молекулярною масою LMW (“Pharmacia”, Швеція): фосфорилаза – 94.0 кДа;

альбумін – 67.0 кДа;

овальбумін – 43.0 кДа;

карбонатангідраза – 30.0 кДа;

інгібітор трипсину – 20.1 кДа;

α-лактальбумін – 14.4 кДа.

## РОЗДІЛ 4 Результати та їх обговорення

### 4.1 Місце виділення досліджуваних бактеріофагів

Важливим питанням екології є вивчення та аналіз взаємовпливу, еволюційного пристосування фітопатогенних бактерій та їх фагів в умовах співіснування в агроценозах. Висока питома вага фітопатогенів, зокрема, *Xanthomonas* серед збудників інфекційних захворювань сільськогосподарських рослин, зумовлює актуальність дослідження природних ізолятів фагів та чутливих до них фітопатогенів. Незважаючи на велике число досліджень, присвячених фагам, їх взаємовідносини в природі вивчені недостатньо. На відміну від лабораторних умов, де традиційно досліджують чисті лінії, в природі мікробні популяції складаються із численних різновидностей фагів та чутливих бактерій, які взаємодіють між собою [12, 13, 14].

Дослідження проводили на основі обстеження агроценозів цукрового буряку. Вибірki для аналізів проводились із окремих польових ділянок.

Таблиця 4.1.

Місце та методи виділення досліджуваних бактеріофагів

Назва ізоляту фагів	Чутлива культура та її штам	Місце виділення
7325/В	<i>X. axonopodis pv. beticola</i> 7325	Полтавська обл.
7325/М	<i>X. axonopodis pv. beticola</i> 7325	Київська обл.

Фітопатогенні бактерії були обрані для дослідження за інфекційними властивостями (здатності викликати хвороби на технічних культурах), що мають практичне значення, наприклад цукровий буряк.

## 4.2 Порівняльна характеристика титрів бактеріофагів 7325/М і 7325/В

Для виділення чистих ліній – проводили не менше шести пасажів, результати титрування представлені у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Порівняльна характеристика титрів бактеріофагів 7325/М і 7325/В, проведених за різними методиками:

	Титрування по Грація, БУО	Spot-test, БУО
7325/М	$10^9$	$10^9$
7325/В	$10^8$	$10^8$

Було помічено, що при пересіванні бактеріофагів 7325/М і 7325/В разом на одну чашку Петрі із чутливою бактеріальною культурою, титр вірусу 7325/В поступово знижується, що може вказувати на міжвірусну взаємодію (конкуренцію).

## 4.3 Спектр літичної активності фагів

При вивченні репродукції вірусів бактерій в природних екосистемах важливим є визначення спектру літичної активності та ефективності їх репродукції. Для фагів, як для біологічного об'єкту, характерною особливістю є пристосування до умов навколишнього середовища. Значна кількість природних і штучно створених факторів прямо та опосередковано впливають як на організм хазяїна, так і фагів. Кожен фаг має коло природних хазяїв, іноді досить широке, а іноді, вузько специфічне, як наприклад, дрібні РНК-геномні фаги.

Одним з критеріїв, що використовують для характеристики фагів є спектр їх літичної активності. Також цей показник важливий при визначенні систематичного положення вірусів бактерій.

При дослідженні ізолятів фагів було визначено спектр їх літичної активності на 19 штаммах культур фітопатогенних бактерій. Два досліджуваних ізоляти виявились полівалентними і лізували декілька індикаторних культур.

Таблиця 4.3

Спектр літичної активності на 19 штаммах фітопатогенних бактерій

Індикаторні культури \ Ізоляти фагів	7325/М	7325/В
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 223	+	+
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>beticola</i> 7325	+	+
<i>E. carotovora</i> 216	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atropaciens</i> 1025	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> 185	-	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 8646	-	-
<i>Pseudomonas chlororophis</i> 8612	-	+
<i>Burkholderia gladiolus</i> pv. <i>allicola</i> 8494	-	-
<i>Ps. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4228	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. 4013	-	-
<i>Pseudomonas viridiflava</i> 8867	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8545	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 8653	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i> 9034	+	+
<i>Pseudomonas viridiflava</i> 8868	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 7591	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8573	+	+
<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> 7750	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 8446	-	-

Можливо отримані дані вказують на адаптацію виділених ізолятів до певних бактерій в біоценозах. Важливим фактором виживання в природі є наявність чутливих бактерій, здатних підтримувати репродукцію фагів. Очевидно, циркуляція фагів в природі може теоретично та, очевидно, і на практиці, йти зі зміною чутливих хазяїв. Не виключено, що в результаті генетичної рекомбінації утворюються нові форми фагів, які відновлюють літичну здатність до індикаторних, або раніше не чутливих до них, бактеріальних культур. Даний факт може свідчити про існування механізмів пристосувань для ефективної репродукції фагів в природі, що забезпечує збереження генофонду популяції.

#### **4.4 Морфологія негативних колоній досліджуваних фагів**

Негативні колонії бактеріофагів, що були отримані та досліджені в лабораторії, розрізнялись за розмірами, особливостями морфології їх бляшок.

Усі досліджувані фаги утворювали прозорі бляшки з мутним ореолом. При посіві фагів методом двошарового агару на чутливій культурі *Xanthomonas axonopodis pv. beticola* 7325, початок їх утворення спостерігався через 6-8 годин. Закінчувалось їх формування ще через 4-6 год.

Порівняння морфології негативних колоній досліджуваних фагів показує їх відмінність, що представлено на рис. 4.1-4.2. Більш детальне вивчення їх властивостей є важливим для аналізу поширення фагів в агроценозах, вивчення їх спектру літичної активності, чутливості до специфічних ендонуклеаз рестрикції.

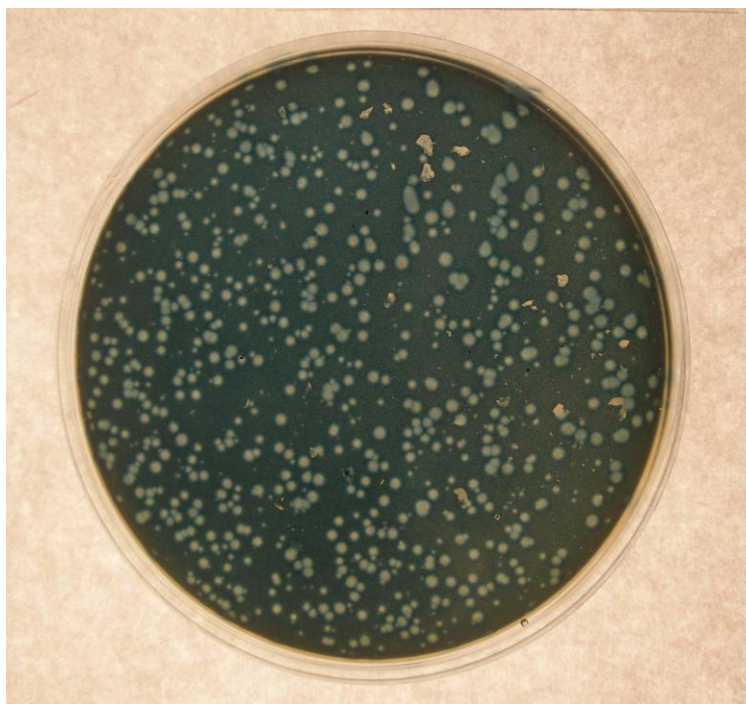


Рис. 4.1. Морфологія негативних колоній фагу 7325/М



Рис. 4.2. Морфологія негативних колоній фагу 7325/В

Фаг 7325/М утворював прозорі бляшки з мутним ореолом, діаметром від 0,1 до 0,5 мм. Фаг 7325/В утворював прозорі бляшки із мутним ореолом до 3-4 мм у діаметрі.

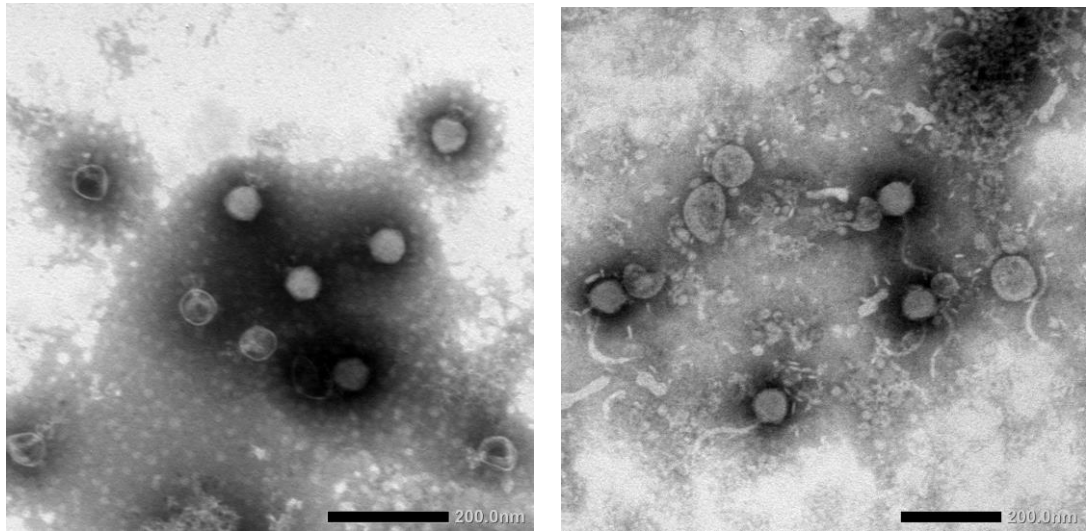
#### 4.5 Електронномікроскопічне дослідження морфології бактеріофагів

Морфологію вірусних часточок вивчали за допомогою електронного мікроскопу (ЕМ-125). Препарати готували методом негативного контрастування ураніацетатом [7].

Аналіз електроннограм показав, що досліджувані фаги були дещо відмінні за будовою віріонів та розміром.

Серед них було виявлено фаги, із ікосаедричною головкою та довгим нескоротливим хвостовим відростком, які відносяться до родини *Siphoviridae*, порядку *Caudovirales* – (7325/М), що мають розміри: діаметр головки –  $70,0 \pm 2$  нм, довжина хвостового відростку –  $131 \pm 2$  нм.

Фаги із ікосаедричною головкою, що не мали довгого відростка, які відносяться до родини *Podoviridae*, порядку *Caudovirales* (7325/В) і мали розміри: діаметр головки –  $43 \pm 1$  нм, довжина хвостового відростку –  $1,8 \pm 0,5$  нм (рис. 4.4)



а)

б)

Рис. 4.4. Електронномікроскопічне зображення фагів *Xanthomonas axonopodis pv. beticola*: а) фаг 7325/В; б) фаг 7325/М.

Інструментальне збільшення 30000.

Таблиця 4.4

Розміри головок та хвостових відростків ізолятів фагів *Xanthomonas axonopodis pv. beticola* 7325

Назва ізоляту	Діаметр головки, нм	Довжина хвостового відростку, нм
7325/В	$43,0 \pm 1$	$1,8 \pm 0,5$
7325/М	$70,0 \pm 2$	$131,6 \pm 2$

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

#### 4.6 Поліпептидний склад досліджуваних фагів

Для порівняння поліпептидного складу фагів, виділених із різних регіонів України, проводили електрофорез білків по Леммлі. Дослідження поліпептидного складу фагів проводили з метою виявлення певних спільних характеристик поліпептидного складу в середині групи фагів, що проявляли біологічну активність до певного бактеріального штаму, та спільно зустрічаються в екосистемах.

Для чутливої культури *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325 порівнювали за числом та електрофоретичною рухливістю фаги: 7325/В та 7325/М. Фаги були виділені із двох регіонів: фаг 7325/В із Полтавської області, фаг 7325/М із Київської області. Їх електрофореграми були подібні, але для кожного із фагів виявлені характерні індивідуальні відмінності (рис. 4.5).

Ці два зразки мають багато подібностей, відрізняються вони лише за деякими поліпептидами. Так, фаг 7325/М має набір 19 поліпептидів у значному діапазоні молекулярних мас, 121 кДа - 13 кДа. Фаг 7325/В має набір 16 поліпептидів у значному діапазоні молекулярних мас, 121 кДа - 13 кДа. Можливо, внаслідок пристосування до умов виживання цей фаг втратив поліпептиди, в порівнянні з іншим вірусом. Він має лише 16 поліпептидів, у порівнянні з іншими, що склалися із 19 поліпептидів. Можна припустити, що фаги цієї групи мали спільного еволюційного попередника, який утворив ряд варіантів, скоріше всього шляхом утворення делеційних мутантів. Число поліпептидів для даної групи складало min 16, max 19.

1 2 М

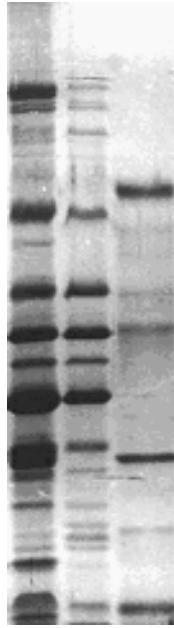


Рис. 4.5 Поліпептидний склад бактеріофагів *Xanthomonas axonopodis pv. beticola* 7325: 1- 7325/B, 7325/M, М – маркер LMV (кДа): 94, 67, 43, 30, 20.1, 14.4

Таблиця 4.5

Молекулярні маси поліпептидів ізолятів фагів *Xanthomonas axonopodis pv. beticola*

Фаг 7325/B, кДа	Фаг 7325/M, кДа
121	121
114	114
111	111
90	90
78	
<b>53</b>	<b>53</b>
<b>36</b>	<b>36</b>
<b>29</b>	<b>29</b>
27	
<b>26</b>	<b>26</b>
<b>25</b>	25
23	23
21	21
20	20
	19,7
<b>19</b>	19
18	18
16	
14	14
13	13

Отримані результати показують, що фаги мають у невеликих кількостях ще інші поліпептиди. Так, у ряді випадків на електрофореграмах фагів спостерігалися дуже слабо зафарбовані ділянки поліпептидів. Однак, дані по ним не приводяться, оскільки їх низькі концентрації знаходилися на межі виявлення даним методом.

## ВИСНОВКИ

1. Виділено та проведено порівняльний аналіз фагів 7325/М і 7325/В із агроценозів Київської та Полтавської областей, які відрізнялись за розміром негативних колоній (1- 8 мм).
2. За морфолого-структурною організацією фаги 7325/В відносяться до подовірусів, із розмірами: діаметр головки –  $43\pm 1$  нм, довжина хвостового відростку –  $1,8\pm 0,5$  нм. Та фаги 7325/М відносяться до сифовірусів із розмірами: діаметр головки –  $70\pm 2$  нм, довжина хвостового відростку –  $131\pm 2$  нм.
3. Визначено спектр літичної активності фагів відносно 19 штамів бактерій, родів *Xanthomonas* та *Pseudomonas*. Показано, що виділені фаги - 7325/В, 7325/М мали широкий спектр літичної активності.
4. Проведено порівняльний аналіз білкового складу фагів, який представлений набором мінорних та мажорних поліпептидів. Визначено число поліпептидів для кожного із ізолятів, та їх молекулярні маси. Значення молекулярних мас знаходились в межах 13-121 кДа, а число становило від 17 до 19 поліпептидів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойко А.Л., Семчук Л.І., Токарчук Л.В., Ромешев С.А. (1997). Фізико-хімічні властивості фагів *Pseudomonas syringae* // Український біохімічний журнал. – № 5-6. – с.133 –137.
2. Векірчик К.М. (2001). *Мікробіологія з основами вірусології: Підручник.* – Київ.- Либідь.
3. Гвоздяк Р.И. (1981). *Изучение фитопатогенных бактерий. Бактериальные болезни растений.* – М.: Колос.
4. Девис Р., Ботстайн Дж. Рот. (1984). *Генетика бактерий.* / М.: Мир, — с.176.
5. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. – под.ред. В.И. Билай. (1988). - Киев: Наукова думка,– с. 451.
6. Лурия С., Дарнелл Дж., Балтимор Д., Кемпбелл Е. (1981). *Общая вирусология.* / М.: Мир.
7. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. (1994). *Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: методологическое руководство.* – СПб.: Наука.
8. Остерман Л.А. (2002). *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот.*- М.: МЦНМО.
9. Практикум по общей вирусологии / Под. ред. Атабекова И.Г. (1981). М.
10. Ромашко А.М., Былинский А.Ф., Ялошевич А.М., Власов А.П. (1990). Фізико-хімічні властивості ДНК представителів популяції бактериофагов псевдомонад. *Мікробіологія*, т. 59. в. 4. – с. 616 – 623.
- 11.Самойленко В.И. (1981). *Современное состояние изученности фагов фитопатогенных бактерий. Бактериальные болезни растений.* –М.: Колос. — с.27-42.

12. Семчук Л.І., Андрійчук О.М., Ромашев С.А., Яцковська Л.І., Ігнатенко Т.О. (2006). Динаміка біологічної активності фагів як фактор впливу на мікрофлору екосистем // *Агроекологічний журнал*. – № 4. – С. 71 –74.
13. Семчук Л.І., Андрійчук О.М., Ромашев С.А., Ігнатенко Т.О. (2007). Вивчення екологічної ролі природних ізолятів фагів фітопатогенних бактерій в агроценозах. *Вісник КНУ Сер. Біол.* – № 49 –50. – с. 26 –30.
14. Семчук Л.І. Токарчук Л.В. (1994). Распространение и специфичность бактериофагов фитопатогенных бактерий в природных биоценозах // *Микробиологічний журнал*. —№56. —с.102.
15. Тихоненко А.С. (1968). *Ультраструктура вирусів бактерій*. М.: Наука, с.90.
16. Токарчук Л.В., Самойленко В.И., Воцелко С.К., Рубан В.И., Гордан К.А. (1987). Свойства вирулентного и умереного фагов, лизирующих бактерий рода *Pseudomonas* // *Проблемы общей и молекулярной биологии*. –Киев. —№6. –с.90-94.
17. Abedon S.T., B. Mahy and M. van Regenmortel (eds.) (2008) Ecology of viruses infecting bacteria // *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. - p.33.
18. Ackermann H.W. and A. Eisentark. (2003). The present state of phage taxonomy. *Intervirology* . – p. 201 –219.
19. Ackermann H.-W., Calendar and S.T. Abedon (eds.). (2006). Classification of bacteriophages. *The Bacteriophages*, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press. – p. 8–16.
20. Ackermann H.-W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. // *Res. Microbiol.*– V.154. – p.245-251.
21. Ackerman H.W. (2008). Bacteriophage taxonomy. // *Microbiol. Sciens.*- V.4, №7. - p.214-218.

22. Applied and Environmental Microbiology. (2004). "Biological Effects of *Trichoderma harzianum* Peptaibols on Mammalian Cells". August Vol. 70, No. 8. - p. 4996-5004.
23. Ashelford K.E., M.J. Day, and J.C. Fry. (2003). Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. // *Appl. Environ. Microbiol.* - Vol.69. - P.285-289.
24. Ashelford K.E., Norris S.J., Fry J.C., Baily M.J. and Day M.J. (2000). Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology.* –№ 66 (10). –p.4193-4199.
25. Balogh B., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Obradovic A., King P., and Jackson L.E. (2002). Efficacy of bacteriophage formulations for control of bacterial spot on tomato // *Phytopathology.* – V.92. – p. 6.
26. Bamford D.H., Rouhianinen L., Takkinen K., Soderlund H. (1981). Comparison of the lipid – containing bacteriophages PRD I, PR 3, PR 4, PR 5 and L17. // *J. Gen. Virol.* – 57. № 2. – p.365.
27. Brussow H. and F. Desiere. (2006). Evolution of tailed phages: insights from comparative phage genomics. *The Bacteriophages*, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press. - pp. 26–36.
28. Bohanna B.J. and R.E. Lenski. (2000). Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. - *Ecology Letters.*– 3. –p. 362 –377.
29. Calendar R. (2005). *The Bacteriophages*. New York: Oxford University Press,–P.896.
30. 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.* –V.36 – pp.98-100.

31. Furuse K. (1987). Distribution of coliphages in the environment: general considerations. *In* S. M. Goyal, C. P. Gerba, and G. Bitton (ed.). Phage ecology. John Wiley & Sons, N.Y. –p. 87 –124.
32. Gvozdyak R.I. (1993). Plant phage bacterium: a new hypothesis of their interrelation // *Microbial.*– 55. – №6.- P. 92-94.
33. Jones J.B., Obradovic A., Balogh B., Momol M.T., and Jackson L.E. (2002). Control of bacterial spot on tomato with bacteriophages. // *Phytopathology.* V.92. – p.108.
34. Hendrix R.W., Cmith C.M., Burns R.N. (1999). Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* —Vol.96. –p. 2192-2197.
35. Hennes K.P., Suttle C.A. and Chan A.M. (1995). Fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.*- .Vol61.- P.3623-3627.
36. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 *Nature.* — Vol. 227. – p.680 –685.
37. Liss A., Ackerman H. (2007). Tailed phages of *Pseudomonas* and related bacteria // *V. Antivirology.*—Vol.2. –p.71–81.
38. Lindstrom K., Kaijalainen S. (1991). Genetic relatedness of bacteriophage infecting *Rhizobium galegae* strains // *FEMS Microbiology Letters* 82. –. – p. 241-246.
39. Muller D.G. (2006). intergeneric transmission of a marine plant DNA virus // *Naturwissenschaften.*— 79.- №1. – P. 50.
40. Molineux I.J. (2001). No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven // *Mol. Microbiol.* —Vol.40. –P.1-8.
41. Neve H.U., Kemper A. Geis and K.J. Heller. (1994). Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophage in a dairy plant. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* — Vol.46. – p.167 –178.

42. Ruban V.I., F.I.Tovkach. (2002). Properties of the temperate phage 59 from *Erwinia carotovora* its DNA and proteins. *Journal of Virology*, June, p. 1018–1021.
43. proAPK//21.03.2008, Інститут цукрових буряків УААН, “Цукрові буряки залишаються однією з найменш прибуткових культур у рослинництві” (<http://www.sugarbeet.gov.ua/news.php?id=26>)
44. Samoilenko V., Chernaya N.E. (1990). Specificity of dacteriophage of *Pseudomonas syringae* // 5<sup>th</sup> Int.Symp.Microb.ecol. (ISME 5), Kyoto, Aug.27-Sept.1.- p. 176.
45. Sandra Chibani-Chennoufi, Anne Bruttin, Marie-Lise Dillmann, and Harald Brüssow. (2004). Phage-Host Interaction // an Ecological Perspective *Journal of Bacteriology*, June Vol. 186, No. 12. - p. 3677-3686.
46. Sonnen H., Schneider J., Kutzner H.J. (1991). Characterization of phi GA1, an inducible phage particle from *Brevibacterium flavum* // *Journal of General Microbiology*. — p. 567–572.
47. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. (2001). Bacteriophage therapy.// *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. –V.45. - pp.649-659.
48. Szybalski W., Szybalski E. (2004). *Viruses, Evolution and Cancer*. – New York,– P.563-580.
49. Wilson W.H., Lane D., Pearce D.A. (2001). Transmission electron microscope analysis of virus-like particles in the freshwater lakes of Signy Island, Antarctica // *Polar Biology*. - №23. – P.657–660.
50. Wommack K.E., and Colwell R.R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*- Vol. 64.- P.69-114.