

## BAKTERIOFAGI KOT ALTERNATIVNI NA IN ZATIRANJA BOLEZNI RASTLIN

Tina NAGLI<sup>1</sup>, Magda TUŠEK ŽNIDARI<sup>2</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>3</sup>, Matjaž PETERKA<sup>4</sup>,  
Tanja DREO<sup>5</sup>

<sup>1,3,4,5</sup>Center odlinosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo, Solkan  
<sup>2,3,5</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,  
Ljubljana

### IZVLE EK

Za bakterijske bolezni rastlin u inkovitega kemijskega varstva ni, zato je razvoj alternativnih na inov zatiranja bolezni zelo pomemben. Odstranjevanje okuženih rastlin sicer pomembno prispeva k zaježitvi širjenja bolezni, vendar je za u inkovito obvladovanje bolezni boljše preventivno varstvo. Ena od možnosti so bakteriofagi, virusi, ki specifi no napadajo bakterije. Pri izolaciji bakteriofagov proti iskani bakteriji se sre amo z mnogimi težavami. V prispevku opisujemo optimizacijo postopka izolacije bakteriofagov iz izbranega materiala (tal) in postopka dolo anja gostiteljskega razpona bakteriofagov v visoko zmogljivostnem formatu. Razvoj uporabe bakteriofagov lahko predstavlja u inkovito varstvo pred boleznimi rastlin.

**Ključne besede:** alternativno varstvo rastlin, bakteriofagi, bakterije

### ABSTRACT

#### BACTERIOPHAGES AS ALTERNATIVE CONTROL OF PLANT DISEASES

Effective chemical protection for bacterial diseases of plants is not known. Elimination of diseased plants is ineffective, therefore the research of effective alternative disease control is needed. Our aim is to develop a plant protection with bacteriophages, that are bacteria specific. When isolating bacteriophages, we are faced with several challenges. In this article we describe basic approach of bacteriophage use. Further more we describe optimisation of bacteriophage isolation from soil and high-throughput method for host range determination of bacteriophages. Optimisation of this approach and development of bacteriophage use can represent the effective plant disease protection.

**Key words:** alternative plant protection, bacteria, bacteriophages

### 1 UVOD

Bakteriofagi so virusi, ki okužujejo bakterije in so v naravi, predvsem v vodi, tleh in v vseh okoljih, kjer najdemo tudi bakterije. So najbolj razširjena oblika življenja na svetu (Hanlon, 2007).

---

<sup>1</sup> univ. dipl. mikrobiol., Velika pot 22, SI-5250 Solkan

<sup>2</sup> dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup> dr. biol. znan., Velika pot 22, SI-5250 Solkan in Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>4</sup> dr. mikrobiol. znan., Velika pot 22, SI-5250 Solkan

<sup>5</sup> dr. biotehn. znan., Velika pot 22, SI-5250 Solkan in Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Bakteriofage, ki so sposobni povzročiti razpad bakterijskih celic (liti ni bakteriofagi), na eloma išemo v bližini gostiteljskih bakterij, na katerih se razmnožujejo. Dokler ne poznamo karakteristik določene bakteriofage, npr. njegovega nukleotidnega zaporedja, ga lahko v naravi zaznamo le z njegovim namnoževanjem na rasto ih gostiteljskih bakterijah. V tleh so bakteriofagi močno vezani na delce tal in zato za ekstrakcijo uporabljamo pufre, ki to vezavo preprečijo. Sprošene bakteriofage ločimo od ne isto in zmešamo z gostiteljskimi bakterijami. Bakteriofag ob stiku prepozna gostiteljsko bakterijo in jo okuži. Podobno kot ostali virusi je sposoben uporabiti celične mehanizme in celotni celični metabolizem preusmeriti v proizvodnjo velike količine kopij bakteriofagnega delca. Ko se novo nastali bakteriofagi sprostijo v okolje, bakterijska celica razpade. Na trdnem gojišču s konfluentno rasto o gostiteljsko bakterijo so poškodbe, ki jih povzročijo bakteriofagi, tako hitre in obsežne, da lahko na gojišču s prostim oesom opazimo območja z bistrivitve, plake, kjer je prišlo do razpada bakterij. Na podoben način lahko bakteriofage namnožimo v več njih količinah in jih uporabimo za nadaljnjo karakterizacijo.

Postopek določanja gostiteljskega razpona je ena od osnovnih metod za opis bakteriofagov, ki nam pove, katere bakterije je bakteriofag sposoben okužiti. Mnogi bakteriofagi so zelo specifični in okužujejo le določene vrste gostiteljskih bakterij. Če želimo rastline zavarovati pred celotnim naborom sevov izbrane vrste bakterij, moramo izbrati več bakteriofagov, katerih gostiteljski razponi se dopolnjujejo. Gostiteljski razpon bakteriofagov ugotavljamo z eno od variant metod plakov: (i) 'plaque assay'-a, v katerem mešanico enega izolata bakterije in enega bakteriofaga razlijemo na petrijevo ploščo umetnega gojišča ali (ii) 'spot assay'-a, kjer na eno petrijevo ploščo premera 90 mm z nacepljenim izolatom tarne bakterije nakaplujemo več bakteriofagov (navadno do 12). V obeh primerih po določenem času inkubacije opazujemo razvoj, velikost in morfologijo plakov (confluent bakterij). Za analizo večjega števila bakteriofagov na več bakterijskih izolatih, kakor je potrebno za praktično uporabo bakteriofagov, je določanje gostiteljskega razpona bakteriofaga zelo zamuden postopek z veliko porabo materiala (petrijevih plošč, nastavkov za pipete), pogoje testiranja za vse vzorce pa težko poenotimo.

V prispevku opisujemo postopek preverjanja učinkovitosti različnih pufrov za izolacijo bakteriofagov iz tal ter optimizacijo določanja gostiteljskega razpona bakteriofagov z uporabo Scienceware® replicatorja za mikrotitrsko ploščico s 96-luknjicami, ki predstavlja visoko zmogljivo različico 'spot assay'-a.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Bakterijski izolati in bakteriofagi

V študijo smo vključili 7 izolatov *Pectobacterium cypripedii*, ki smo jih pridobili iz zbirke National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBB, Food and Environmental Research Agency, UK). Bakterije smo hranili na sistemu MicroBank™ pri temperaturi pod -76 °C. Bakterije smo gojili na trdnih gojiščih LB Luria pri temperaturi 25-28 °C. Modelni bakteriofag smo izolirali iz listov orhidej z bolezenskimi znamenji gnitja in obogatili z mešanico izolatov *Pectobacterium cypripedii* iz zbirke.

### 2.2 Primerjava raztopin za izolacijo bakteriofagov iz tal

Za uspešno izolacijo (sprostitve) bakteriofagov iz tal je v literaturi opisanih več različnih raztopin. V poskusu izolacije bakteriofagov smo primerjali 5 raztopin, ki naj bi omogočale učinkovito sprošanje bakteriofagov iz tal: TSB (Trypticase Soy Broth) (pH 7), TSB (pH 9), 1 % kalijev citrat, 10 % goveji ekstrakt, deionizirana sterilna voda (Twist in Kropinski, 2009). Po 45 mL vsake posamezne raztopine smo zmešali z znano koncentracijo modelnega bakteriofaga ( $50 \mu\text{L } 3,5 \times 10^{10} \text{ pfu/mL}$ ) in 5 gramih travniških tal, ki smo jo prej 24 ur sušili pri 37

°C. V poskus smo vklju ili negativno kontrolo, pri emer smo za izolacijo bakteriofagov iz posušenih tal, v katero nismo posebej dodali bakteriofagov, uporabili raztopino TSB (pH 9). Suspenzije smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi s stalnim obra anjem centrifugirk na aparaturi Heto Mastermix. Po stresanju smo suspenzije centrifugirali 10 minut pri 10.000 g, supernatant prelili v novo centrifugirko in ponovili centrifugiranje pri istih pogojih. Supernatant, v katerem smo pri akovali bakteriofage, smo filtrirali skozi filter z 0,2  $\mu$ m porami. Preostalo suspenzijo smo hranili pri +4 °C oziroma pod -76 °C. Zastopanost bakteriofagov v suspenzijah, pripravljenih z razli nimi raztopinami, smo preverjali z metodo plakov, kjer smo na gojiš u opazovali razgraditev bakterijskih celic v obliki plakov. Postopek smo izvedli v treh ponovitvah. Za dolo anje izkoristka izolacije bakteriofagov po izolaciji iz tal smo plake prešteli in dolo ili povpre no koncentracijo izoliranih bakteriofagov ter jo izrazili kot 'plaque forming unit' na mL (pfu/mL). Izkoristek smo dolo ili z izra unom razmerja med izoliranimi in dodanimi bakteriofagi.

### 2.3 Optimizacija postopka dolo anja gostiteljskega razpona

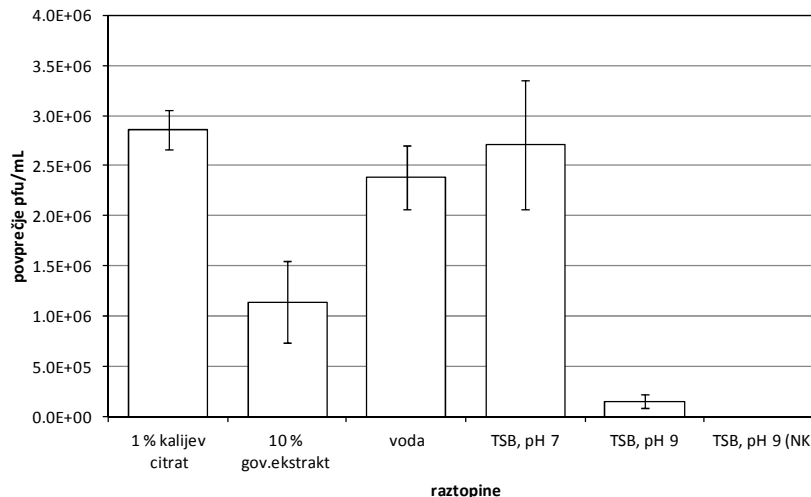
Za optimizacijo dolo anja gostiteljskega razpona smo uporabili ve je petrijeveve ploš e (premer 140 mm) z bakterijsko travico, ki omogo ajo nanos in hkratno evalvacijo do 96 razli nih bakteriofagov, nanosenih v formatu mikrotitrne ploš ice s pomo jo Scienceware® replicatorja (Sigma, Z370819). Bakteriofage, shranjene v mikrotitrski ploš ici, smo s sterilnim Scienceware® replicatorjem previdno prenesli na ploš o z bakterijsko travico, tako da smo na travico odložili kapljice bakteriofagne suspenzije. Ploš e smo inkubirali preko no i pri temperaturi 25-28 °C.

275

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.1 Primerjava raztopin za izolacijo bakteriofagov iz tal

Primerjava raztopin za izolacijo modelnega bakteriofaga iz tal je pokazala manjše razlike med uporabljenimi teko inami. Najboljši izkoristek izolacije bakteriofagov (izolirani bakteriofagi/dodani bakteriofagi) smo dosegli z uporabo 1 % kalijevega citrata (slika 1).



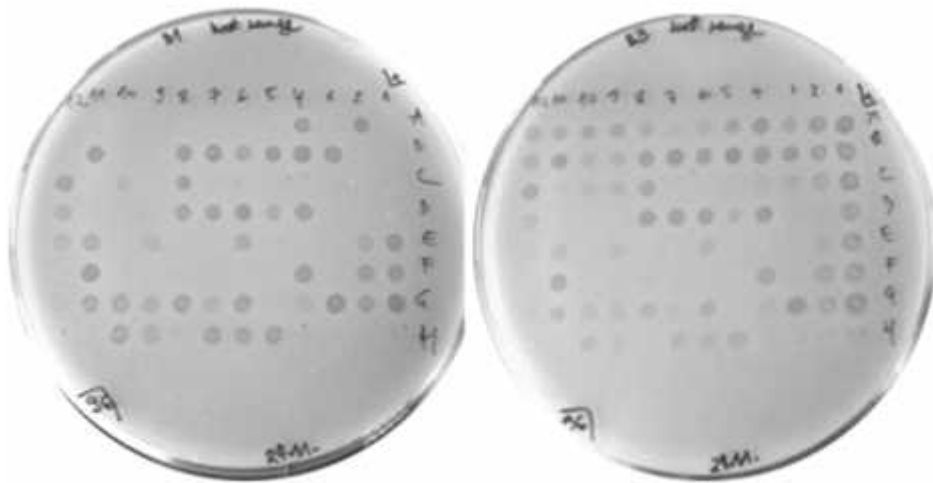
Slika 1: Koli ina izoliranih modelnih bakteriofagov iz tal z znano enako za etno koncentracijo bakteriofagov z uporabo razli nih raztopin. Prikazane so povpre ne vrednosti (pfu/mL raztopine) dolo ene v treh ponovitvah in standardni odklon meritev.

Figure 1: Amount of model bacteriophage (pfu/mL) isolated from soil, spiked with equal initial concentration of model bacteriophage, using different extraction solutions. Average values of three repeats with standard deviations are shown.

Zelo dober izkoristek kažeta tudi gojiš e TSB (pH 7) in deionizirana sterilna voda. Za izolacijo modelnega bakteriofaga je bilo najmanj ustrezno gojiš e TSB s pH vrednostjo 9.

### 3.2 Optimizacija postopka dolo anja gostiteljskega razpona

Postopek dolo anja gostiteljskega razpona bakteriofagov smo optimizirali z vidika porabljenega materiala, asa in ponovljivosti testa z uporabo ve jih petrijevih ploš (premer 140 mm) z naneseno bakterijsko travico, na katere lahko z uporabo Scienceware® replicatorja (Sigma, Z370819) v enem koraku hkrati nanesemo do 96 razli nih bakteriofagov (slika 2). Najpomembnejše prednosti takšnega postopka so: (i) hkrati lahko analiziramo ve je število bakteriofagov, (ii) zagotovimo enake pogoje za vse testirane bakteriofage na eni ploš i (enem sevu gostiteljske bakterije), (iii) zmanjšamo porabo potrošnega materiala (replikator je mogo e o istiti in avtoklavirati), (iv) lažje primerjamo velikost, obliko in jakost cone lize ter nenazadnje (v) prihranimo na asu priprave materiala in same izvedbe testa.



Slika 2: Dolo anje gostiteljskega razpona izbranih bakteriofagov v visoko zmogljivostnem formatu. Bakteriofagi so z replikatorjem Scienceware® za mikrotitrne ploš ice s 96-luknjicami nanešeni na bakterijsko travico dveh razli nih bakterij.

Figure 2: High-throughput host range determination of selected bacteriophages. Bacteriophages are added on bacterial lawn of two different bacteria with Scienceware® 96-well replicator.

## 4 SKLEPI

Uporabljene raztopine so bile razli no u inkovite za izolacijo modelnega bakteriofaga iz tal. Razlike v izkoristku bakteriofagov na uporabljenem modelu niso bile velike, zato lahko sklepamo, da optimizacija tega postopka ni vedno potrebna.

Za izolacijo modelnega bakteriofaga iz tal je bil najbolj primeren 1 % kalijev citrat, najslabši izkoristek je bil z uporabo gojiš a TSB s pH vrednostjo 9.

Z optimiziranim postopkom dolo anja gostiteljskega razpona bakteriofagov smo:

- dosegli hkratno analizo ve jega števila bakteriofagov,
- poenotili pogoje za vse testirane bakteriofage, ki so tako naneseni na eni ploš i (96 fagov na ploš o),
- olajšali primerjavo velikosti in oblike plakov, ker se vsi razvijajo v enakih razmerah,
- zmanjšali porabo materiala/petrijev, nastavkov za pipete,
- skrajšali as priprave in evalvacije.

Z optimizacijo postopka dolo anja gostiteljskega razpona bakteriofagov smo dosegli ve jo u inkovitost (glede na število vzorcev) in standardiziranost postopka v primerjavi z objavljenimi postopki.

## **5 ZAHVALA**

Center odli nosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo (COBIK) je operacija, ki jo financirata Evropska unija, Evropski sklad za regionalni razvoj, in Republika Slovenija, Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo. Za vsesplošno pomo in rastlinski material se zahvaljujemo Tomažu Jevšniku iz podjetja Ocean Orchids. Iskrena hvala tudi sodelavcem COBIK-a in NIB-a za vzorce tal ter ideje in nasvete.

## **6 VIRI**

Hanlon G.W. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 118-128.  
Van Twest R., Kropinski A. M. Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. V: Clokie M.R.J, Kropinski A. M. 2009. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Vol.1: Isolation, Characterisation, and Interactions*.