

Zaštita bilja

Vol. 63 (2), N<sup>o</sup> 280, 62-75, 2012, Beograd

UDK: 632.937.1;

57.063.9

Naučni rad

## IZOLACIJA BAKTERIOFAGA I NJIHOVA PRIMENA U DIFERENCIJACIJI SOJEVA *XANTHOMONAS* SPP.

KATARINA GAŠIĆ<sup>1</sup>, MILAN IVANOVIĆ<sup>2</sup>, ANĐELKA PROKIĆ<sup>2</sup>, NEMANJA KUZMANOVIĆ<sup>2</sup>,  
MAJA IGNJATOV<sup>3</sup>, ALEKSA OBRADOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd

<sup>3</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

e-mail: gasickatarina@yahoo.com

### REZIME

Bakteriofagi predstavljaju posebnu grupu virusa čiji su domaćini bakterije. Usled nedostatka efikasnih baktericida i pojave rezistentnih sojeva bakterija prema većini do sada korišćenih antibiotika, primena faga kao bioloških agenasa u kontroli bolesti prouzrokovanih fitopatogenim bakterijama, dobija sve veći značaj. Zahvaljujući izraženoj specifičnosti, fagi se osim za suzbijanje koriste i za diferencijaciju srodnih vrsta fitopatogenih bakterija. U ovom radu izolovano je 25 faga specifičnih prema vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*, prouzrokovaču bakteriozne pegavosti paprike. Fagi su izolovani iz uzoraka zemljišta, vode i semena paprike poreklom iz različitih lokaliteta u Srbiji. Pored faga izolovanih u Srbiji, proverena je specifičnost 53 soja dobijenih iz kolekcije Univerziteta u Floridi i izdvojen set faga koji se mogu koristiti u diferencijaciji vrsta *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* i *X. gardneri*.

**Ključne reči:** bakteriofagi, *Xanthomonas euvesicatoria*, izolacija, paprika, diferencijacija

### UVOD

Bakteriofagi ili jednostavnije fagi predstavljaju posebnu grupu virusa koji inficiraju bakterijsku ćeliju. Oni spadaju u najbrojnije mikroorganizme na planeti, koji sa bakterijama koevoluiraju unazad 3 - 4 milijarde godina; procenjuje se da ih ima oko  $10^{32}$  (Hanlon, 2007). Bakteriofagi se mogu naći na svim mestima gde i bakterije, uključujući zemljište, vodu, bilj-

ke, životinje (Adams, 1959; Woods i sar., 1981; Obradović i sar., 2006; Gašić i sar., 2011) i čoveka (Osawa i sar., 1981).

Životni ciklus bakteriofaga može biti litički i lizogeni. Litički odnos karakteriše se brzim umnožavanjem faga u bakterijskoj ćeliji nakon ubacivanja nukleinskog materijala i oslobađanjem novih faga posle lizisa, odnosno raspadaanja bakterijske ćelije. Lizogeni odnos ostvaruje umereni fag, koji se u inficiranoj ćeliji zadržava

u obliku svoje nukleinske kiseline ugrađene u bakterijski hromozom (profag), i tako se prenosi deobom na potomstvo bakterije.

Iako su bakteriofagi najbrojniji biološki agensi na planeti, njihov opstanak u prirodi umnogome zavisi od uticaja različitih faktora spoljne sredine (Balogh i sar., 2007). Gill i Abedon (2003) su saopštili da rizosfera predstavlja povoljniju sredinu za opstanak faga u poređenju sa filosferom, s obzirom da su fagi češće izolovani iz te sredine i mogu duže vremena preživeti u zemljištu nego na lisnoj površini. Međutim, brzina širenja faga kroz neujednačeni sastav zemljišta je niska i promenljiva usled promene nivoa slobodne vode. Pored toga, fagi mogu biti imobilisani biofilmom u supstratu (Storey i Ashbolt, 2001) kao i adsorbovani od strane zemljišnih čestica, posebno gline (Williams i sar., 1987). Niska pH vrednost supstrata takođe može izazvati inaktivaciju faga (Sykes i sar., 1981). U filosferi, glavni ograničavajući faktori za opstanak faga su ultraljubičasto zračenje (UV zračenja) i isušivanje (Gill i Abedon, 2003). Takođe, visoka temperatura, visoka ili niska pH vrednost i osmotski pritisak utiču na inaktivaciju faga na površini listova biljke (Iriarte i sar., 2007).

Od otkrića, početkom dvadesetog veka, fagi su proučavani u cilju kontrole bolesti izazvanih bakterijama, uključujući i bolesti biljaka. Međutim, interesovanje za primenu faga kao bioloških agenasa posebno je intenzivirano poslednjih godina, s pojavom sojeva bakterija rezistentnih prema jedinjenjima bakra i antibiotcima (Marco i Stall, 1983; Minsavage i sar., 1990; Thayer i Stall, 1961). Od 1990-ih terapija fagima se pokazala efikasnom u suzbijanju različitih bolesti prouzrokovanih bakterijama roda *Xanthomonas*: bakteriozne pegavosti paradajza (Flaherty i sar., 2000; Balogh i sar., 2003; Obradović i sar., 2004a, 2005), bakteriozne pegavosti breskve (Civerolo i Keil, 1969; Saccardi i sar., 1993),

bakteriozne pegavosti muškate (Flaherty i sar., 2001), bakteriozne plamenjače oraha (McNeil i sar., 2001), lisne plamenjače crnog luka (Lang i sar., 2007) i bakterioznog raka i pegavosti citrusa (Balogh i sar., 2008).

Pored primene u suzbijanju bolesti izazvanih bakterijama, bakteriofagi su korišćeni i u drugim oblastima fitopatologije. Zahvaljujući visokoj specifičnosti odnosa virus – bakterija domaćin, fagi su omogućili razlikovanje srodnih vrsta fitopatogenih bakterija kao i rasa ili patogena varijeteta iste bakterijske vrste i tako značajno doprineli klasifikaciji i identifikaciji patogena bakterija (Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997). Identifikacija bakterija korišćenjem faga je jednostavna, brza i efikasna u poređenju sa drugim konvencionalnim metodama, s obzirom da je potreban relativno kratak period (18-24 h inkubacije) da bi se očitali rezultati, odnosno formirali plakovi kao znak pozitivne reakcije.

Bakteriozna pegavost prouzrokovana *Xanthomonas* vrstama, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri* (Jones i sar., 2004), spada u red ekonomski najznačajnijih bolesti paprike i paradajza u svetu, posebno u uslovima tropske i subtropske klime. Do sada je u svetu opisano 11 fizioloških rasa bakterije *Xanthomonas euvesicatoria*, od kojih je u našoj zemlji prisutno četiri (P1, P3, P7, P8), a rasa P8 je najzastupljenija (Ignjatov i sar., 2012). *X. euvesicatoria* nalazi se na A2 EPPO karantinskoj listi (European and Mediterranean Plant Protection Organization), kao i na A2 listi karantinskih štetnih organizama Republike Srbije. U agroekološkim uslovima Srbije prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti paprike *X. euvesicatoria* redovno se pojavljuje i prouzrokuje značajne štete, naročito tokom vlažnog i toplog vremena (Balaž, 1994; Obradović i sar., 1997, 1999, 2000a, 2000b, 2001).

Imajući u vidu heterogenost populacije

*Xanthomonas* spp. patogena paprike i paradajza (Jones i sar., 2004) kao i njihovo prisustvo i štetnost, naročito u proizvodnji paprike u nas (Obrodović i sar., 2004b), utvrđivanje prisustva specifičnih bakteriofaga u rejonima gajenja paprike u Srbiji i proučavanje mogućnosti njihove primene u suzbijanju patogena imalo bi višestruk značaj. Stoga je cilj rada bio utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti bakteriofaga specifičnih prema vrsti *X. euvesicatoria*, izolacijom iz različitih supstrata, dok bi se proverom litičke aktivnosti i specifičnosti faga utvrdila mogućnost njihove primene u diferencijaciji vrsta roda *Xanthomonas*, parazita paprike i paradajza.

## MATERIJAL I METODE

U istraživanjima je korišćeno 3 soja bakterije *Xanthomonas euvesicatoria* KFB1, KFB13 i KFB189, zatim vrsta *Xanthomonas vesicatoria* soj KFB29, *Xanthomonas perforans* soj KFB061, *Xanthomonas gardneri* soj KFB0116. Sojevi bakterija čuvani su pri temperaturi  $-80^{\circ}\text{C}$  u podlozi od hranljivog bujona sa 30% glicerola. Bakterijske kulture su održavane periodičnim presejavanjem na standardnu bakteriološku podlogu hranljivi agar (HA, agar 18,0 g, hranljivi bujon 23,0 g, destilovana voda 1,0 l). Pri izvođenju oglada korišćene su kulture bakterija gajene 24 h na HA pri temperaturi  $27^{\circ}\text{C}$  u termostatu.

Za proučavanje aktivnosti faga u *in vitro* uslovima korišćena je polučvrsta hranljiva podloga sa kvašćevim ekstraktom (Nutrient agar yeast extract medium, NYA) (0,8% hranljivi bujon, 0,6% agar, 0,2% kvašćev ekstrakt) ili hranljivi bujon kao tečna podloga.

### Izolacija bakteriofaga iz različitih prirodnih supstrata

Tokom 2005, 2007. i 2008. godine prikupljeni su uzorci za izolaciju bakteriofaga sa više

lokaliteta u Srbiji. Kao materijal za izolaciju specifičnih faga korišćene su obolele biljke paprike sa izraženim simptomima bakteriozne pegavosti (3 uzorka), zatim zemljište uzeto neposredno ispod zaraženih biljaka (25 uzoraka), voda iz bunara (4 uzorka) kao i seme paprike za setvu (4 uzorka). Izolacija faga vršena je na dva načina: metodom direktne izolacije i metodom obogaćivanja supstrata.

Metodom direktne izolacije faga obrađeni su uzorci zemljišta iz zone korenovog sistema paprike. Oko 200 g zemljišta potopljeno je u 200 ml 0,01 M magnezijum-sulfatnog rastvora u laboratorijskoj čaši i nakon kraćeg mešanja na magnetnoj mešalici inkubirano preko noći pri sobnoj temperaturi. Sutradan, pažljivo je odlicena tečna faza i nakon centrifugiranja pri 12 000 g u trajanju 10 min, supernatant je pipetom prenet u sterilne staklene kolbe. Zatim je dodat hloroform (10:1 v/v) i nakon sat vremena tretiranja, u sterilne mikroeprove izdvojena je gornja faza suspenzije u kojoj se očekuje prisustvo faga i dalje čuvana u frižideru pri temperaturi  $4^{\circ}\text{C}$ , zaštićena od svetlosti.

Metoda obogaćivanja supstrata (Carlson, 2005; Balogh, lična komunikacija) omogućava selektivno umnožavanje bakteriofaga specifičnih prema bakteriji domaćinu koja se dodaje supstratu sa podlogom. Na taj način se, povećanjem koncentracije omogućava uspešnija detekcija i izolacija faga. Prilikom izolacije faga ovom metodom, za obogaćivanje supstrata korišćeni su sojevi *X. euvesicatoria* KFB1, KFB13 i KFB189, izolovani iz paprike poreklom iz Srbije. U prvoj fazi izolacije faga u kolbu koja sadrži 50 ml hranljivog bujona i 2,5 g  $\text{CaCO}_3$  dodato je 5 ml indikator bakterije suspendovane u sterilnoj česmenskoj vodi i odgovarajuća količina uzorka, 10 g zemljišta, 5 g biljnog tkiva ili 50 ml vode. Suspenzije su postavljene na rotacionu mešalicu u termostatu pri  $27^{\circ}\text{C}$ , tokom 24 h. Nakon inkuba-

cije, vršena je ekstrakcija faga centrifugiranjem 1 ml obogaćene suspenzije 5 min na 16 000 g, kako bi se otklonili ostaci podloge i bakterijskih ćelija. Supernatant je prenet u nove sterilne mikroeprovete i tretiran hloroformom (10:1 v/v) u trajanju 20 min, uz povremeno mešanje. Posle taloženja, gornja faza suspenzije izdvojena je u nove sterilne mikroeprovete, koje su potom obeležene i čuvane pri temperaturi 4°C, zaštićene od svetlosti, do upotrebe.

#### **Provera prisustva bakteriofaga**

Prisustvo specifičnih faga u uzorcima provereno je na osnovu formiranja plakova u podlozi kao znak aktivnosti faga prema kompatibilnoj bakteriji domaćinu. U ogledu su kao domaćini korišćeni sojevi *X. euvesicatoria* KFB 1, KFB 13 i KFB 189. Na dno prazne Petri kutije naneto je po 100 µl bakterijske suspenzije pripremljene u 0,01 M magnezijum-sulfatnom rastvoru i dodata odgovarajuća količina NYA podloge, ohlađene do temperature 46 – 50°C, tako da prekrije dno. Bakterijska suspenzija i podloga izmešane su horizontalnim kružnim pokretima Petri kutije nekoliko puta. Po očvršćavanju podloge, naneto je po 10 µl suspenzije uzorka na površinu podloge i nakon 24 – 48 h inkubacije u termostatu, posmatrana je pojava plakova na mestu nanošenja kapi suspenzije.

#### **Prečišćavanje bakteriofaga**

Pri izolaciji faga iz prirodne sredine, mora se imati u vidu da se populacija faga može sastojati iz više sojeva specifičnih prema istom domaćinu (Mullan, 2001). Različiti fagi mogu se izdvojiti procesom prečišćavanja na osnovu izgleda plakova u podlozi.

Kako bi se dobili pojedinačni plakovi u podlozi, suspenzija faga je razređena u sterilnoj česmenskoj vodi u odnosu 1:10. Na dno prazne Petri kutije naneto je 100 µl suspenzije kompati-

bilnog soja *X. euvesicatoria* pripremljene u sterilnoj česmenskoj vodi i 100 µl suspenzije faga određenog razređenja. Zatim je dodata odgovarajuća količina prohlađene (48°C) NYA podloge tako da prekrije dno. Suspenzije i podloga su izmešane kružnim pokretima Petri kutije nekoliko puta, kako bi se postigla ravnomerna distribucija bakterija i faga u podlozi. Nakon očvršćavanja podloge, Petri kutije su postavljene u termostat pri 27°C i po isteku 24 h inkubacije posmatrana je pojava i izgled pojedinačnih plakova.

Prečišćavanje faga vršeno je kroz tri serije, iz pojedinačnih, morfološki identičnih plakova. Sterilnom čačalicom odvojen je deo plaka sa podlogom i resuspendovan u 100 µl sterilne destilovne vode u mikroeproveti. Nakon mešanja pomoću tresilice pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju od nekoliko sekundi, napravljena su još dva razređenja u odnosu 1:10 u sterilnoj destilovanoj vodi. Po 100 µl suspenzije faga svakog razređenja i 100 µl suspenzije kompatibilnog soja bakterije u 0,01 M magnezijum-sulfatnom rastvoru, zasejano je u NYA podlozi na prethono opisan način. Nakon 24 h inkubacije u termostatu posmatrani su formirani plakovi. Postupak je ponovljen još dva puta izborom iste forme plakova.

Po završetku procesa prečišćavanja, kada su svi plakovi u Petri kutiji bili ujednačene forme, podloga iz kutije sa najvećom koncentracijom faga prenet je u sterilnu laboratorijsku čašu i usitnjena u 10 – 15 ml sterilne destilovane vode, kako bi usitnjeni agar poprimio tečnu formu. Čitav sadržaj je zatim centrifugiran 20 min na 8 000 g kako bi se uklonili ostaci ćelija i podloge, nakon čega je supernatant odliven u sterilnu staklenu posudu i tretiran hloroformom (10:1 v/v). Nakon taloženja tokom 1 h, sterilnom pipetom odvojena je gornja, bistra faza u kojoj se nalaze fagi u sterilnu posudu od tamnog stakla i nakon provere titra čuvana na 4°C. Očekivana

koncentracija faga u ovoj suspenziji iznosi oko  $10^9$  PFU/ml.

#### **Određivanje titra bakteriofaga**

U cilju određivanja titra prečišćene suspenzije faga, napravljeno je deset razređenja suspenzije faga u odnosu 1:10, u sterilnoj česmenskoj vodi. Na dno prazne Petri kutije naneto je 100  $\mu$ l suspenzije kompatibilnog soja *X. euvesicatoria*, pripremljene u sterilnoj česmenskoj vodi i 100  $\mu$ l suspenzije faga određenog razređenja. Zatim je dodata odgovarajuća količina NYA podloge ohlađene do 48°C, tako da prekrije dno. Suspenzije i podloga izmešane su kružnim pokretima Petri kutije nekoliko puta i nakon očvršćavanja podloge, postavljene su u termostat na 27°C. Nakon 24 h inkubacije, posmatrani su plakovi u podlozi. Na osnovu broja formiranih plakova u određenim razređenjima, vršeno je izračunavanje titra faga izraženog u broju formiranih plakova po ml suspenzije (plaque forming units/ml, PFU/ml) (Klement i sar., 1990).

#### **Umnožavanje i čuvanje bakteriofaga**

Kako bi se dobila suspenzija faga visokog titra i time omogućilo korišćenje faga u *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim uslovima, vršeno je njihovo umnožavanje. Fagi su umnoženi u kulturi bakterije domaćina gajenoj u hranljivom bujonu. Kompatibilni soj *X. euvesicatoria* KFB 189 zasejan je u 100 ml hranljivog bujona. U eksponencijalnoj fazi porasta, pri koncentraciji  $10^8$  CFU/ml ( $OD_{600} = 0,3$ ), dodata je odgovarajuća količina faga tako da odnos broja čestica faga i ćelija bakterije bude oko 1:10 (multiplicity of infection, MOI = 0,1). Kolbe su zatim postavljene u laminarnu komoru tokom 5 min, a zatim na rotacionu mešalicu u termostat na 150 rpm pri temperaturi 27°C. Po isteku 19 h inkubacije dodato je 10 ml hloroforma (10:1 v/v) i uz postepeno mešanje vršeno je tretiranje tokom 0,5 – 1 h.

Zatim je pažljivo izdvojena gornja faza u zatamnjenu sterilnu bocu i nakon provere titra čuvana pri temperaturi 4°C. Ovom metodom se obezbeđuje titar faga oko  $10^{10}$  PFU/ml.

Za čuvanje faga u kolekciji na duži vremenski period, 100  $\mu$ l suspenzije faga i 100  $\mu$ l suspenzije bakterije domaćina pomešano je u sterilnoj mikroepreveti. Nakon 5 min, tokom kojih je došlo do adsorpcije faga na površinu bakterijske ćelije, suspenzija je pipetom prenetna u krioeprevetu sa 2 ml podloge od hranljivog bujona i 30% glicerola i čuvana pri – 80°C.

#### **Diferencijacija sojeva *Xanthomonas* spp. bakteriofagima**

Zahvaljujući saradnji sa kolegama sa Univerziteta u Floridi (SAD), Laboratorije za fitobakteriologiju, Odseka za biljnu patologiju, dobijeno je 53 soja faga iz njihove kolekcije. Proučena je specifičnost ovih sojeva prema različitim vrstama roda *Xanthomonas*, patogena paradajza i paprike u cilju izdvajanja seta faga na osnovu kojih se može na brz i efikasan način izvršiti diferencijacija bakterija *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri*.

Na dno prazne Petri kutije naneto je po 100  $\mu$ l suspenzije svakog soja bakterije u sterilnoj česmenskoj vodi i dodata prohlađena NYA podloga. Po očvršćavanju, pipetom je na površinu podloge naneto po 4  $\mu$ l suspenzije faga. Nakon 24 h inkubacije u termostatu pri temperaturi 27°C, posmatrana je pojava plakova. Test je urađen u tri ponavljanja.

## **REZULTATI**

#### **Izolacija bakteriofaga iz prirodnih supstrata**

U cilju izolacije specifičnih bakteriofaga prikupljeni su uzorci zemljišta, vode, semena paprike, kao i biljaka paprike sa izraženim simptomima bakteriozne pegavosti. Bakteriofagi

**Tabela 1.** Izolovani sojevi bakteriofaga.  
**Table 1.** Bacteriophage strains.

Šifra soja	Supstrat	Lokalitet	Godina izolacije
KΦ 1	Zemljište	Družetić	2005
KΦ 2	Seme paprike	Medveđa	2007
KΦ 3	Zemljište	Medveđa	2007
KΦ 4	Voda iz bunara	Medveđa	2007
KΦ 5	Zemljište	Brus	2007
KΦ 6	Seme paprike	Medveđa	2007
KΦ 7	Zemljište	Medveđa	2007
KΦ 8	Zemljište	Brus	2007
KΦ 9	Zemljište	Despotovo	2008
KΦ 10	Zemljište	Despotovo	2008
KΦ 11	Zemljište	Horgoš	2008
KΦ 12	Zemljište	Horgoš	2008
KΦ 13	Zemljište	Despotovo	2008
KΦ 14	Zemljište	Bačka Palanka	2008
KΦ 15	Zemljište	Tovariševo	2008
KΦ 16	Zemljište	Bašaid	2008
KΦ 17	Zemljište	Senta	2008
KΦ 18	Zemljište	Kikinda	2008
KΦ 19	Zemljište	Novi Kneževac	2008
KΦ 20	Zemljište	Gospođinci	2008
KΦ 21	Zemljište	Gospođinci	2008
KΦ 22	Zemljište	Gložan	2008
KΦ 23	Zemljište	Gložan	2008
KΦ 24	Zemljište	Pivnice	2008
KΦ 25	Zemljište	Silbaš	2008

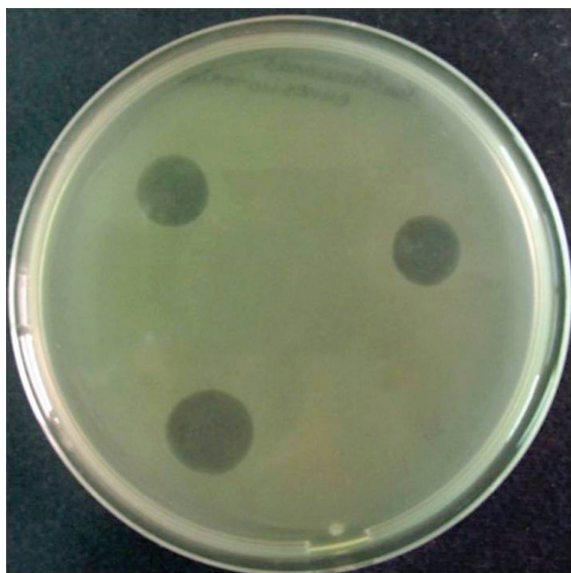
specifični za *X. euvesicatoria*, izolovani su metodom direktne izolacije i metodom obogaćivanja supstrata, iz 25 od ukupno 36 testiranih uzoraka. Dvadeset dva soja faga potiču iz zemljišta, dva soja su poreklom iz semena paprike i jedan soj iz vode, dok iz biljaka paprike sa simptomima bakterijske pegavosti nisu izolovani fagi (Tabela 1). Uspešnost izolacije iznosila je oko 70%.

#### Provera prisustva i čuvanje bakteriofaga

Prisustvo faga u uzorcima utvrđeno je pojavom plakova, tj. prosvetljenih zona kružnog oblika nastalih usled lizisa bakterijskih ćelija, u hranljivoj podlozi nakon 24 – 48 h inkubacije u termostatu pri temperaturi 27°C (Slika 1). Svi izo-

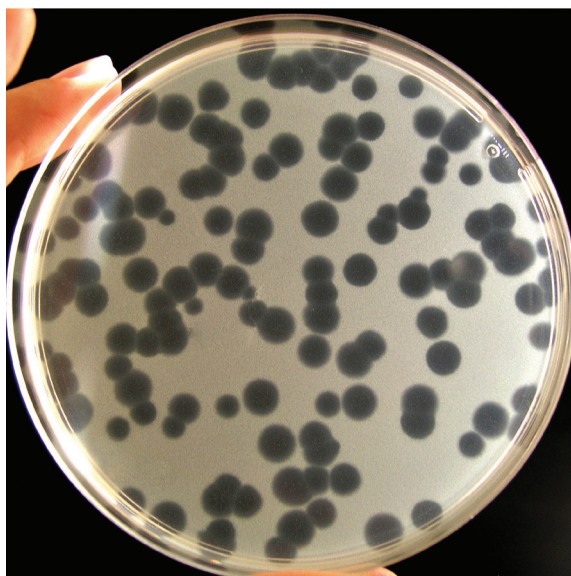
lovani fagi ispoljili su litičku aktivnost prema sojevima *X. euvesicatoria* KFB1, KFB 13 i KFB 189. Nakon prečišćavanja faga kroz tri serije iz pojedinačnih, morfološki identičnih plakova, dobijena je identična forma plakova u podlozi (Slika 2). Koncentracija faga nakon prečišćavanja iznosila je oko 10<sup>9</sup> PFU/ml. Prečišćeni fagi umnoženi su do koncentracije oko 10<sup>10</sup> PFU/ml u kulturi bakterija u hranljivom bujonu i čuvani pri temperaturi 4°C, zaštićeni od svetlosti.

Vitalnost faga proverena je i nakon godinu dana čuvanja u podlozi od hranljivog bujona sa 30% glicerola, zajedno sa bakterijom domaćinom, pri temperaturi -80°C. Svi sojevi faga uspešno su revitalizovani.



**Slika 1.** Bakteriofagi specifični prema *X. euvesicatoria*. Formirani plakovi u NYA podlozi ukazuju na prisustvo bakteriofaga.

**Figure 1.** Bacteriophages specific to *X. euvesicatoria*. Plaques formation in NYA medium indicates the presence of bacteriophages.



**Slika 2.** Bakteriofagi specifični prema *X. euvesicatoria*. Ujednačena forma plakova nakon prečišćavanja bakteriofaga.

**Figure 2.** Bacteriophages specific to *X. euvesicatoria*. Uniformity of plaques obtained after procedure of phage purification.

### Diferencijacija sojeva *Xanthomonas* spp. bakteriofagima

Proučavanjem 53 soja faga dobijenih iz

kolekcije Univerziteta u Floridi, utvrđena je litička aktivnost 21 soja faga prema najmanje jednom soju *X. euvesicatoria* (Tabela 2). Dvanaest sojeva faga liziralo je sva tri soja *X. euvesicatoria* KFB 1, KFB 13 i KFB 189. Jedan soj (KØ 050) ispoljio je specifičnost prema P8 fiziološkoj rasi *X. euvesicatoria*, s obzirom da je lizirao samo sojeve KFB 1 i KFB 189. Fagi KØ 034 i KØ 037 ispoljili su specifičnost prema rasi P7, lizirajući *X. euvesicatoria* soj KFB 13. Sedam sojeva faga bilo je specifično prema *X. perforans* soju KFB 061. Među proučavanim fagima izdvojena su dva soja, KØ 018 i KFB 040, koji su ispoljili aktivnost prema vrstama *X. euvesicatoria* i *X. perforans*.

Na osnovu uočene specifičnosti, izdvojena su četiri soja faga koji se mogu koristiti za diferencijaciju sojeva *Xanthomonas* spp. (Tabela 3). Soj faga KØ 050 može se upotrebiti za diferencijaciju sojeva *X. euvesicatoria* rase P8 od ostalih *Xanthomonas* spp. Soj faga KØ 034 omogućava razlikovanje *X. euvesicatoria*, rase P7 od rase P8 istog patogena kao i od ostalih *Xanthomonas* spp. Za diferencijaciju *X. euvesicatoria* i *X. perforans* od ostalih *Xanthomonas* spp. može se upotrebiti fag KØ 040, dok se za diferencijaciju *X. perforans* može koristiti soj KØ 053. Ukoliko nijedan od izabranih faga nije ispoljio aktivnost prema testiranom soju bakterije, može se zaključiti da se radi o vrstama *X. vesicatoria* ili *X. gardneri*. Treba napomenuti da se umesto sojeva faga koji su navedeni u Tabeli 3, za diferencijaciju *Xanthomonas* spp. može koristiti bilo koji soj iz proučavane inostrane kolekcije faga sa istim spektrom domaćina (Tabela 2).

Za diferencijaciju sojeva *X. euvesicatoria* od ostalih *Xanthomonas* spp., mogu se koristiti i fagi izolovani u ovom radu, s obzirom da su svi sojevi ispoljili specifičnost prema vrsti *X. euvesicatoria*.

Tabela 2. Specifičnost bakteriofaga poreklom iz SAD prema *Xanthomonas* spp.  
 Table 2. Specificity of bacteriophages from USA to *Xanthomonas* spp.

KΦ	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X. gardneri</i>
	KFB 1	KFB 13	KFB 189	KFB 29	KFB 061	KFB 0116
01	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-
04	+	-	-	-	-	-
05	-	-	-	-	-	-
06	-	-	-	-	-	-
07	+	-	-	-	-	-
08	+	-	-	-	-	-
09	-	-	-	-	-	-
010	-	-	-	-	-	-
011	-	-	-	-	-	-
012	-	-	-	-	-	-
013	-	-	-	-	+	-
014	-	-	-	-	+	-
015	-	-	-	-	-	-
016	-	-	-	-	-	-
017	-	-	-	-	+	-
018	+	-	-	-	+	-
019	-	-	-	-	+	-
020	-	-	-	-	+	-
021	-	-	-	-	+	-
022	-	-	-	-	-	-
023	-	-	-	-	-	-
024	-	-	-	-	-	-
025	+	+	+	-	-	-
026	+	+	+	-	-	-
027	+	+	+	-	-	-
028	+	+	+	-	-	-
029	+	+	+	-	-	-
030	+	+	+	-	-	-
031	-	-	-	-	-	-
032	+	+	+	-	-	-
033	+	+	+	-	-	-
034	-	+	-	-	-	-
035	+	+	+	-	-	-
036	+	+	+	-	-	-
037	-	+	-	-	-	-
038	+	+	+	-	-	-
039	+	+	+	-	-	-
040	-	+	+	-	+	-
041	-	-	-	-	-	-
042	-	-	-	-	-	-
043	+	-	-	-	-	-
044	-	-	-	-	-	-
045	-	-	-	-	-	-
046	-	-	-	-	-	-
047	-	-	-	-	-	-
048	-	-	-	-	-	-
049	-	-	-	-	-	-



**Tabela 3.** Bakteriofagi kojima se mogu diferencirati *Xanthomonas* spp.  
**Table 3.** Bacteriophages that can be used in *Xanthomonas* spp. differentiation.

	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X. gardneri</i>
KΦ	KFB 1	KFB 13	KFB 189	KFB 29	KFB 061	KFB 0116
050	+	-	+	-	-	-
034	-	+	-	-	-	-
040	-	+	+	-	+	-
053	-	-	-	-	+	-

**Legenda:** + formiranje plaka, - izostanak formiranja plaka  
**Legend:** + plaque formation, - no plaque formation

## DISKUSIJA

Poslednjih godina, proučavanje bakteriofaga sve više privlači pažnju istraživača. Eksperimentalno je pokazano da se fagi sa visokom efikasnošću mogu koristiti kao biološki agensi (Jones i sar., 2007). Činjenice da su opšte rasprostranjeni prirodni neprijatelji bakterija, jednostavni za gajenje i održavanje, specifični prema domaćinu, pogodni za integraciju sa drugim mehanizama zaštite, bezopasni po čoveka i druge činioce biosfere, daju im značajnu prednost nad drugim sredstvima baktericidnog dejstva. Osim toga, od ranije je poznato da se bakteriofagi mogu koristiti u detekciji, identifikaciji i klasifikaciji fitopatogenih bakterija, imajući u vidu njihovu visoku specifičnost prema pojedinim bakterijskim sojevima.

U ovom radu izolovano je 25 sojeva faga (Tabela 1) specifičnih prema vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*, prouzrokovaču bakteriozne pegavosti paprike. Bakteriofagi su, metodom direktne izolacije i metodom obogaćivanja supstrata, izolovani iz uzoraka zemljišta na kome je gajena paprika, kao i iz vode korišćene za zalivanje paprike i iz semena paprike za setvu. Uspešnost izolacije faga iznosila je oko 70%. Većina izolovanih faga potiče iz zemljišta u neposrednoj blizini korena zaraženih biljaka, dok izolacija iz nekoliko uzoraka obolelih biljaka paprike nije bila uspešna. Na probleme prilikom izolacije faga iz filozofere ukazali su i drugi autori (Okabe i Goto, 1963; Erskine, 1973; Flaherty i sar, 2001; Gill i

sar., 2003). Ova pojava može se objasniti činjenicom da zemljište, u poređenju sa nadzemnim delovima biljke, predstavlja povoljniju sredinu za opstanak faga. Fagi su u prirodi amfoterni, ispoljavaju negativno naelektrisanje pri pH vrednosti karakterističnoj za većinu zemljišta (Burge i Enkiri, 1978). U zemljištu se fagi štite od inaktivacije adsorbovanjem za naelektrisane zemljišne koloidne kao što je glina (Reaney i sar., 1983; Williams i sar., 1987). Takođe, zemljište obezbeđuje zaštitu od UV zračenja i isušivanja, dva glavna faktora koja utiču na vitalnost faga (Adams, 1959; Erskine, 1973; Iriarte i sar., 2007). Iako su češće izolovani iz zemljišta nego iz nadzemnih delova biljaka (Gill i Abedon, 2003), smatra se da bi fagi izolovani iz filozofere bili bolje prilagođeni za preživljavanje i umnožavanje na površini biljaka, pa samim tim i bolji kandidati za biološke agense. Ovoj konstataciji ide u prilog istraživanje Iriarte i sar. (2007) po kojima su fagi izolovani iz ove sredine bili otporni prema isušivanju.

S obzirom da je pri izolaciji faga korišćen hloroform za eliminaciju neliziranih bakterijskih ćelija, svi sojevi bili su rezistentni prema ovom jedinjenju. Moguće je da je upotreba hloroforma onemogućila izolaciju faga iz nekoliko uzorka, usled njihove osetljivosti prema ovom jedinjenju. Naime, u početku se mislilo da je ovo retka pojava (Adams, 1959), dok je u novije vreme pojava osetljivosti faga prema hloroformu postala široko prisutna (Ackermann i DuBow, 1987). S druge strane, fagi koji se teško održavaju nisu poželjni kao agensi u biološkoj kontroli,

s obzirom da jednostavna proizvodnja i čuvanje faga predstavljaju uslov za njihovu primenu u polju (Schisler i Slininger, 1997).

Specifičnost faga prema pojedinim vrstama ili sojevima bakterija često je korišćena u identifikaciji biljnih patogena (Thornberry i sar., 1949; Billing, 1963, 1970; Dye i sar., 1964; Stolp i Starr, 1964; Czes, 1984), s obzirom da je procedura detekcije plakova veoma brza i efikasna. Na osnovu različite specifičnosti 53 soja faga prema vrstama *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* i *X. perforans*, izdvojen je set od četiri faga kojima se mogu diferencirati ove vrste (Tabela 2 i 3). Ovaj set faga takođe omogućava diferencijaciju rasa P7 i P8 vrste *X. euvesicatoria*.

Rezultatima naših istraživanja potvrđeno je prisustvo bakteriofaga u neposrednom okru-

ženju obolelih biljaka paprike, sposobnih da izvrše infekciju bakterije domaćina i izazovu lizis ćelija. Time je uspešno izveden prvi korak ka potencijalnoj primeni ovih bioloških agensa u zaštiti paprike od bakteriozne pegavosti.

## ZAHVALNICA

Istraživanja su obavljena u okviru projekta III46008 „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane” i TR31030 „Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru“ koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- Ackermann, H. W., DuBow, M. S. (1987): Viruses of Prokaryotes, vol. II. Natural groups of bacteriophages, CRC Press, Boca Raton, FL, 85–100.
- Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers, New York.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S-print, Novi Sad.
- Balaž, J. (1994): Leaf spot of pepper caused by bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Contemporary Agriculture, special edition, 42: 341–345.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradović, A., King, B., Jackson, L. E. (2003): Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot of tomato. Plant Disease, 87: 949–954.
- Balogh, B., Iriarte, F.B., Obradović, A., Momol, M.T., Jones, J.B. (2007): Phages don't have it easy. Phytopathology, 97: S141.
- Balogh, B., Canteros, B. I., Stall, R. E., Jones J. B. (2008): Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. Plant Disease, 92: 1048–1052.
- Billing, E. (1963): The value of phage sensitivity tests for the identification of phytopathogenic *Pseudomonas* spp. Journal of Applied Microbiology, 33: 478–491.
- Billing, E. (1970). Further studies on the phage sensitivity tests for the identification of phytopathogenic *Pseudomonas* spp. Journal of Applied Microbiology, 33: 478–491.
- Burge, W. D., Enkiri, N. K. (1978): Virus adsorption by five soils. Journal of Environmental Quality, 7: 73–76.
- Carlson, K. (2005): Appendix: Working with bacteriophages: Common techniques and methodological

- approaches. In: Bacteriophages: Biology and Applications. Eds. Kutter, E., Sulakvelidze, A. CRC Press, Boca Raton, FL, 437-494.
- Civerolo, E. L., Keil, H. L. (1969): Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*, 12: 1966-1967.
- Cupples, D. A. (1984): The use of pathovar-indicative bacteriophage leaf and fruit lesions. *Phytopathology*, 74: 891-894.
- Dye, D. W., Starr, M. P., Stolp, H. (1964): Taxonomic clarification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity and cultural characteristics. *Phytopathologische Zeitschrift*, 51: 394-407.
- Erskine, J. M. (1973): Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. *Canadian Journal of Microbiology*, 19: 837-845.
- Flaherty, J. E., Jones, J. B., Harbaugh, B. K., Somodi, G. C., Jackson, L. E. (2000): Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h-mutant bacteriophages. *HortScience*, 35: 882-884.
- Flaherty, J. E., Harbaugh, B. K., Jones, J. B., Somodi, G. C., Jackson, L. E. (2001): H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *HortScience*, 36: 98-100.
- Gašić, K., Ivanović, M. M., Ignjatov, M., Čalić, A., Obradović A. (2011): Isolation and characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*, 93 (2), 415-423.
- Gill J., Abedon, S. T. (2003): Bacteriophage ecology and plants. American Phytopathological Society. [aps@scisoc.org](mailto:aps@scisoc.org)
- Gill, J. J., Svircev, A. M., Smith, R., Castle, A. J. (2003): Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2133-2138.
- Hanlon, J. W. (2007): Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 118-128.
- Ignjatov, M., Šević, M., Gašić, K., Jovičić, D., Nikolić, Z., Milošević, D., Obradović, A. (2012): Proučavanje osetljivosti odabranih genotipova paprike prema prouzročivaču bakterijske pegavosti. *Ratararstvo i povrtarstvo*, 49 (2): 177-182.
- Iriarte, B. F., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, M. L., Wilson, M., Jones, J. B. (2007): Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1704-1711.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Shaad, N. (2004): Reclassification of *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755-762.
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradović, A., Iriarte, F. B., Momol, M. T. (2007): Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 245-262.
- Klement, Z., Rudolf, K., Sands, D. C. (1990): Methods in phyto bacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Lang, J. M., Gent, D. H., Schwartz, H. F. (2007): Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Disease*, 91: 871-878.
- Marco, G. M., Stall, R. E. (1983): Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, 67: 779-781.
- McNeil, D. L., Romero, S., Kandula, J., Stark, C., Stewart, A., Larsen, S. (2001): Bacteriophages: a potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*). *New Zealand Plant Protection*, 54: 220-224.

- Minsavage, G. V., Canteros, B. I., Stall, R. E. (1990): Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 80: 719–723.
- Mullan, W. M. A. (2001): Isolation and purification of bacteriophages. ŠOn-lineĆ <http://www.dairyscience.info/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html> .
- Obradović, A., Arsenijević, M., Mijatović, M. (1997): Bakterioze paprika. Treće jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea, 33–34.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M. (1999): Characterization of pathogenic bacteria isolated from pepper in Yugoslavia. *Phytopathologia*, 29: 40–41.
- Obradović, A., Arsenijević, M., Mavridis, A., Rudolph, K. (2000a): Patogene i biohemijsko-fiziološke karakteristike sojeva *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* patogena paprika u Srbiji. *Zaštita bilja*, 51: 157–175.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M. (2000b): Bacterial spot of capsicum and tomato in Yugoslavia. *EPPO Bulletin* 30: 333–336.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M., Mijatović, M. (2001): Bacterial diseases of pepper in Yugoslavia. In: *Plant Pathogenic Bacteria*. Ed. De Boer, S. H. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 255–258.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Balogh, B., Olson, S. M. (2004a): Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease*, 88: 736–740.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijević, M., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Wang, J. F. (2004b): Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 285–292.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Jackson, L. E., Balogh, B., Guven, K., Iriarte, F. B. (2005): Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 89: 712–716.
- Obradović, A., Gašić, K., Ivanović, M. (2006): Izolacija bakteriofaga specifičnih prema sojevima *Xanthomonas euvesicatoria* patogenu paprike u Srbiji. VIII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea, 74.
- Okabe, N., Goto, M., (1963): Bacteriophages of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1: 397–418.
- Osawa, S., Furuse, K., Watanabe, I. (1981): Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 164–166.
- Reaney, D. C., Gowland, P. C., Slater, J. H. (1983): Genetic interactions among microbial communities. In: *Microbes in their natural environments*. Ed. Slater, J. H. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. pp. 379–422.
- Saccardi, A., Gambin, E., Zaccardelli, M., Barone, G., Mazzucchi, U. (1993): *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. *Phytopathologia Mediterranea*, 32: 206–210.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J. (1997): Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 172 – 179.

- Stolp, H., Starr, M. P. (1964): Bacteriophage reaction and speciation of phytopathogenic *Xanthomonads*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 51: 442-428.
- Storey, M. V., Ashbolt, N. J. (2001): Persistence of two model enteric viruses (B408 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms. *Water Science and Technology*. 43: 133-38.
- Sykes, I. K., Lanning, S., Williams, S. T. (1981): The effect of pH on soil actinophage. *Journal of General Microbiology*, 122: 271-80.
- Thayer, P. L., Stall, R. E. (1961): A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 75: 163-165.
- Thornberry, H. H., Braun, A. C., Elrod, R. P. (1949): Application of the bacteriophage-lysis technique for the identification of plant pathogenic bacteria. *Phytopathology*, 39: 152-155.
- Williams, S. T., Mortimer, A. M., Manchester, L. (1987): Ecology of soil bacteriophages. In: *Phage Ecology*. Eds. Goyal, S. M., Gerba, C. P., Bitton, G. New York: Wiley, 157-179.
- Woods, T. L., Israel, H. W., Sherf, A. F. (1981): Isolation and partial characterization of a bacteriophage of *Erwinia stewartii* from the corn flea beetle *Chaetocnema pulicaria*. *Protection Ecology*, 3: 229-36.

**(Primljeno: 27.08.2012.)**

**(Prihvaćeno: 21.09.2012.)**

## ISOLATION OF BACTERIOPHAGES AND THEIR USE IN *XANTHOMONAS* SPP. DIFFERENTIATION

KATARINA GAŠIĆ<sup>1</sup>, MILAN IVANOVIĆ<sup>2</sup>, ANDELKA PROKIĆ<sup>2</sup>, NEMANJA KUZMANOVIĆ<sup>2</sup>,  
MAJA IGNJATOV<sup>3</sup>, ALEKSA OBRADOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

<sup>2</sup>University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade

<sup>3</sup>Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

*e-mail: gasickatarina@yahoo.com*

### SUMMARY

Bacteriophages are viruses that infect bacteria. Due to poor efficacy of copper compounds and occurrence of antibiotic resistant bacterial strains, interest in phage therapy has increased in the recent years. In addition to being used for disease control, the high specificity of bacteriophages makes them useful in differentiation of closely related species of plant pathogenic bacteria. In this research, twenty five phages, specific to *Xanthomonas euvesicatoria*, causal agent of pepper bacterial spot, were isolated. Host specificity determination performed with 53 phages from University of Florida collection resulted in set of phages which could be used for differentiation of *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* and *X. gardneri*.

**Key words:** bacteriophages, *Xanthomonas euvesicatoria*, isolation, pepper, differentiation

**(Received: 27.08.2012.)**

**(Accepted: 21.09.2012.)**