

## Bakteriofagi za obvladovanje črne žilavke kapusnic

### Uvod

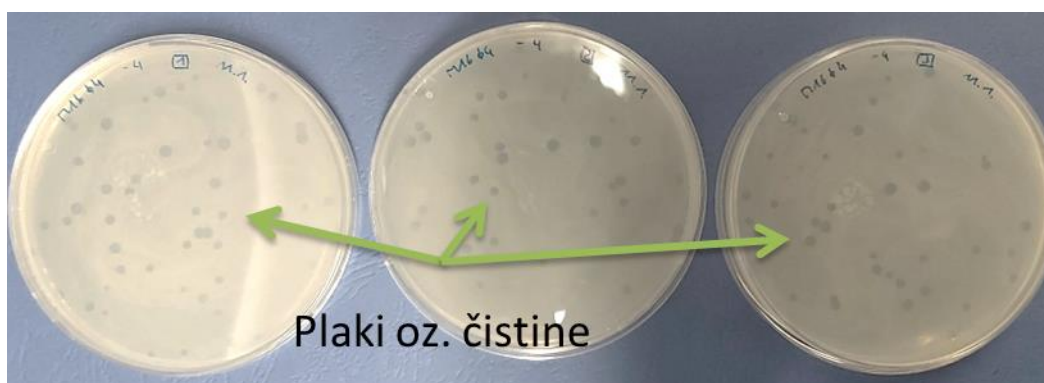
Bakteriofagi so virusi, ki okužujejo bakterije. So zelo specifični, na druge organizme pa nimajo vpliva. Uporaba bakteriofagov oz. fagov za omejevanje bakterijskih okužb ima v kmetijstvu velik potencial. V zadnjih letih je bilo opravljenih precej raziskav, obstajajo pa že nekateri komercialni pripravki na osnovi bakteriofagov (npr. proti hruševemu ožigu – *Erwinia amylovora*), vendar njihova uporaba v EU še ni dovoljena.

Med leti 2020 in 2022 smo po Sloveniji nabrali več vzorcev kapusnic, ki so kazale znake okužbe s črno žilavko kapusnic (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). Iz rastlinskega materiala ali iz zemlje nabrane neposredno v okolici okuženih rastlin smo izolirali fage. V naslednjem koraku smo izolirane fage očistili in jih delno karakterizirali. Določili smo jim koncentracijo in ugotavljali učinkovitost posameznih fagov na različnih bakterijskih sevih Xcc.

Cilj raziskave je najdba več različnih fagov, tarčno usmerjenih proti različnim sevom Xcc, s katerimi bi lahko uspešno nadzorovali bolezen črne žilavke na kapusnicah. Dobro poznavanje delovanja izbranih fagov je pri tem ključno.

### Materiali in metode

Iz izoliranih in očiščenih fagov smo pripravili redčitve in z njimi okuževali bakterijski sev Xcc CZ06/19. Po 24-urni inkubaciji smo prešteli čistine na gojišču. Iz teh podatkov smo izračunali koncentracije fagov v začetni suspenziji (PFU/ml oz. plaque forming units/ml).



Očiščene fage smo testirali na zmožnost okuževanja različnih sevov bakterij Xcc. V primeru pojava čistin, smo ocenili ali gre za motno ali bistro čistino. Bistre čistine povzročijo fagi, ki imajo litičen cikel delovanja, rezultat takšnega cikla pa je propad oziroma liza bakterijske celice. Motne čistine so značilne za temperatne fage, ki imajo kompleksnejši način delovanja ob vstopu v bakterijsko celico. Zmožni so namreč integracije lastne nukleinske kisline v kromosom bakterije. Ob ustreznih pogojih pa lahko prav tako povzročijo lizo bakterijske celice. Takšni fagi v varstvu rastlin niso primerni, zato iščemo zgolj litične fage.

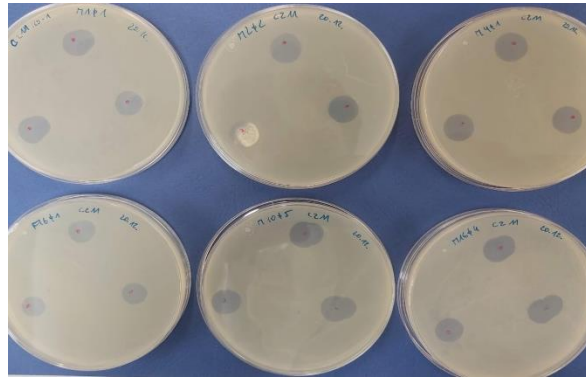
## Rezultati

Izmed 20 sevov bakterij je bilo 5 takšnih, ki niso bili dovzetni na okužbo s testiranimi fagi. Fag M6φ1 je okužil 11 različnih sevov bakterij, pri katerih je povzročil bistre čistine. Preostali fagi so okužili 15 sevov, vendar so bile nekatere čistine motne. Pri motnih čistinah smo določili, ali gre za motno ali zelo motno čistino.

Preglednica 1. Rezultati preizkusa spektra delovanja izoliranih fagov.

Sev	Gostitelj	Lokacija	Bakteriofag					
			M1φ1	M2φ2	M4φ1	M6φ1	M10φ5	M16φ4
<b>CZ01/20-1</b>	zelje (belo)	Ljubljana	+	+	+	+	+	+
<b>CZ02/20-2</b>	zelje (belo)	Ljubljana	-	-	-	-	-	-
<b>CZ03/20-1</b>	zelje (belo), Megaton	Sp. Brnik	+	+	+	+	+	+
<b>CZ04/20-1</b>	zelje (belo), Almanah	Voklo	-	-	-	-	-	-
<b>CZ05/20-1</b>	zelje (belo), Megaton	Voglje	-	-	-	-	-	-
<b>CZ06/20-1</b>	zelje (belo), Capton	Sp. Brnik	+	+	+	+	+	+
<b>CZ07/20-1</b>	zelje (belo)	Dvorjane	+	+	+	+	+	+
<b>CZ08/20</b>	zelje (belo)	Dogoše	+	+	+	+	+	+
<b>CZ09/20-2</b>	zelje (belo)	Sodinci	-	-	-	-	-	-
<b>CZ10/20-1</b>	zelje (belo), Ljubljansko	Ljubljana	+	+	+	+	+	+
<b>CZ11/20-1</b>	zelje (belo), Ljubljansko	Ljubljana	+	+	+	+	+	+
<b>CZ12/20-1</b>	kitajski kapus	Ljubljana	-	-	-	-	-	-
<b>OH 1/21</b>	glavnati ohrovt	Ljubljana	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)
<b>OH 2/21</b>	glavnati ohrovt	Ljubljana	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)
<b>25-1/21</b>	brstični ohrovt	Ljubljana	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)
<b>32-1/21</b>	brstični ohrovt	Ljubljana	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)
<b>77-1/21</b>	zelje (belo)	Velesovo	+	+	+	+	+	+
<b>21-1072-3</b>	zelje (belo)	Zg. Duplek	+	+	+	+	+	+
<b>60-1/21</b>	brstični ohrovt	Pečnik	+	+	+	+	+	+
<b>22-0901-1</b>	zelje (belo)	Ljubljana	+	+	+	+	+	+

+ - bistra čistina, (+) – motna čistina, - - brez čistin



Slika 1: Na gojiščih vidimo bistro čistino, ki jih je vseh 6 testiranih fagov povzročilo ob okužbi seva CZ11/20-1. Uporabljen sev bakterije je v tem primeru občutljiv na izbran fag. Če se pojavi motna čistina lahko to pomeni, da gre za temperaten fag, ki se ob vstopu v gostiteljsko celico vključi v bakterijski kromosom.

## Sklepi

Najbolj učinkovito obvladovanje bakterijskih bolezni je z uporabo antibiotikov. A tako v medicini kot veterini opažajo porast na antibiotike odpornih sevov. V medicini se je uporaba fagov kot načina obvladovanja najtrdozratnejših bakterij zelo razširila. Njihova uporaba se širi tudi na področje kmetijstva in se kaže kot ena od boljših možnosti za obvladovanje bakterijske bolezni.

Uspelo nam je pridobiti kar nekaj potencialnih fagov, ki bi jih lahko uporabili v varstvu zelja pred črno žilavko. Hkrati pa ugotavljamo, da moramo v prihodnje nasloviti tudi vprašanje stabilnosti. Fagi so občutljivi za UV sevanje, zato bo potrebno preučiti možnosti stabilizacije fagov

Besedilo: Aljoša Beber, dr. Janja Lamovšek

Datum: 23.1.2023