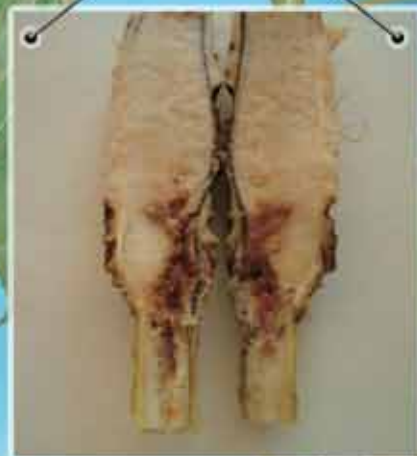


К. А. МИРОШНИКОВ

# ФАГИ НА ГРЯДКАХ

## Проблемы и перспективы применения бактериофагов в растениеводстве



Встреча с бактериями зачастую заканчивается катастрофой для растения – разрушением тканей, поражением корневой и сосудистой систем. И даже когда бактериоз не приводит к непосредственной гибели, развитие растения замедляется, снижается его урожайность, теряется товарный вид плодов. Для контроля над фитопатогенными бактериями достаточно долго и вполне успешно использовали специальные сельскохозяйственные препараты – как правило, неочищенные и удешевленные версии медицинских антибиотиков стрептомицинового и тетрациклинового ряда. Однако этот путь весьма опасен и непредсказуем по последствиям с точки зрения как глобальной экологии, так и нашего здоровья

Слева: бактериальный ожог и стеблевая гниль растения подсолнечника, вызванные *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Эта бактерия поражает также корневую систему, которая некротизирует и загнивает, так как выделяемый бактерией высокомолекулярный полисахарид приводит к закупорке сосудов. Это заболевание, впервые описанное в 1981 г. в США, в последние годы получает все более широкое распространение. Фото подсолнухов: © Creative Commons



МИРОШНИКОВ Константин Анатольевич – доктор химических наук, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (Москва), научный консультант Исследовательского центра «ФитоИнженерия» (Московская обл., Рогачево). Автор и соавтор 44 научных работ

Действие фитопатогенных бактерий наносит значительный урон мировому сельскому хозяйству. Борьба же с такими инфекциями всегда непростая. Как правило, сельскохозяйственно значимые растения выращиваются на больших площадях, и в этом случае индивидуальный мониторинг и обработка каждого растения – процесс очень трудоемкий и дорогой, если вообще возможный. В растениеводстве борьба с сорными растениями, вредоносными насекомыми и грибами осуществляется путем сплошной обработки полей препаратами соответствующих гербицидов, пестицидов и фунгицидов.

В последнее десятилетие мировое медицинское сообщество бьет тревогу в связи со стремительным распространением разновидностей (*штаммов*) болезнетворных бактерий, устойчивых к нескольким классам

**Ключевые слова:** болезни сельскохозяйственных растений, бактериофаг, фаготерапия, белковая инженерия, энзимология, молекулярная диагностика.

**Key words:** diseases of agricultural plant, bacteriophage, phage therapy, protein engineering, enzymology, molecular diagnostics

© К. А. Мирошников

применяемых в клинической практике антибиотиков. Инфекции, вызванные такими бактериями, приводят к тяжелейшим осложнениям, затрудняют и затягивают лечение болезней, приводя к тысячам смертей и колоссальным экономическим потерям.

Важно отметить, что наибольшую опасность представляют внутрибольничные инфекции, вызванные штаммами, которые циркулируют в медицинских учреждениях: подвергаясь постоянному давлению в результате применения противомикробных препаратов, эти бактерии приспосабливаются к ним, приобретая множественную устойчивость к антибиотикам.

Вероятность подхватить подобную антибиотикоустойчивую инфекцию «на улице» пока что сравнительно невысока, так как медицинские антибиотики оказывают влияние на окружающую среду лишь в местах своего постоянного использования. Однако этот «недостаток» с лихвой перекрывается антибиотиками сельскохозяйственными, десятки тысяч тонн которых ежегодно используются в мире для борьбы с бактериозами животных и растений. Именно со злоупотреблением сельскохозяйственными противомикробными препаратами связывают массовое появление «условных патогенов» – распространенных в природе бактерий, не представляющих особой опасности для здорового человека, но способных поражать людей с ослабленным иммунитетом. При этом в силу антибиотикоустойчивости избавиться от них почти невозможно.

Поэтому законодательные меры по ограничению использования антибиотиков в сельском хозяйстве, особенно не в лечебных, а в профилактических целях, – весьма разумный шаг с точки зрения мирового здравоохранения. И в свете этой ситуации ориентация на «зеленое растениеводство», направленное на максимальное сохранение урожайности и разнообразия растительных культур при минимальном использовании ксенобиотиков, становится не столько модой, сколько рациональным ответом на существующие вызовы.

## На пути к зеленому земледелию

*Зеленое земледелие* – это вовсе не граничащие с идиотизмом концепции типа «пусть наши овощи корявенькие и со средневековой урожайностью, зато на навозе выращенные, и все червячки руками удалены». Это гармоничное сочетание современных достижений сельскохозяйственной науки: новых устойчивых и урожайных сортов, современной механизированной агротехники, рассчитанного применения комбинаций органических и неорганических удобрений, мониторинга урожайности и заболеваемости, технологичного хранения и переработки урожая. В комплекс таких мер входит и научно

обоснованное адаптированное применение биологических средств контроля.

Под *биоконтролем* мы понимаем использование живых организмов – специфических хищников или паразитов – для подавления популяций вредителей в сельскохозяйственных угодьях. В частности для борьбы с бактериальными инфекциями растений представляется привлекательной стратегия использования *бактериофагов* – бактериальных вирусов, нацеленных на конкретные патогены. Эта концепция имеет много достоинств. Фаги – естественные обитатели тех же экологических ниш, что и бактерии; соответственно, их использование не влияет на состояние крупных экологических систем. Их селекция и применение логичны, сравнительно просты и недороги. Сельскохозяйственную «фаготерапию» можно сочетать с большинством других методов химического и биологического контроля, при этом она безопасна как для самих растений, так и для человека и животных.

Однако следует иметь в виду, что фаговый фитоконтроль – не панацея против растительных патогенов. Для успешного внедрения любой фаготерапии, в том числе и растительной, требуется детальное понимание биологии и геномики бактериофагов и целевых микроорганизмов, изучение их взаимодействия, селекция подходящих фагов. Научоемкость этого метода кажется, на первый взгляд, пугающей. Но насколько эти опасения реалистичны, и каковы перспективы у сельскохозяйственной фаготерапии?

## Как все начиналось

Когда в начале XX в. Ф. д'Эрелль предложил вирусную теорию инфекционного лизиса бактерий, то по мере осознания и принятия этой теории у исследователей во всем мире рос энтузиазм по поводу перспектив применения бактериофагов. Ведь это было время до открытия и массового применения антибиотиков, ставших позднее «золотым стандартом» лечения бактериальных инфекций. В 1920–1930-х гг. эффективных методов контроля заболеваний, вызванных бактериями, практически не существовало, и немудрено, что фаги сразу начали тестировать как терапевтические агенты для лечения практически всех известных заболеваний микробиологической природы.

Самые ранние задокументированные эксперименты по контролю и лечению бактериальных болезней растений были проведены в Университете штата Мичиган (США). В 1924 г. У. Молман и К. Хемстрит показали, что фильтрат из тканей капусты, пораженной *Xanthomonas campestris*, способен подавлять рост патогена в лабораторных условиях. На следующий год Д. Котила и Д. Кунс показали, что фаги, специфические против возбудителя черной ножки картофеля, можно



Возбудитель сосудистого бактериоза *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* развивается на всех крестоцветных культурах, включая турнепс (слева), но наибольший ущерб наносит цветной и белокочанной капусте (справа)

выделить непосредственно из почвы. При нанесении на клубни картофеля и корнеплоды моркови одновременно бактериофага и возбудителя этой болезни – бактерию *Erwinia carotovora* (современное название *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), гниение происходило только в тех пробах, где отсутствовал фаг.

В 1934 г. английский исследователь Р. Месси дал объяснение интригующему факту, что частота и интенсивность болезни хлопчатника – так называемого «бактериального ожога», вызываемой бактерией *Xanthomonas malvacearum*, была меньше на землях, которые затоплялись водами Нила. Он предположил, что основной причиной ограничения интенсивности болезни являются фаги, приносимые речными водами, и на следующий год доказал свою гипотезу, обнаружив фаги в почве только затопляемых участков.

Несмотря на эти результаты, ранние работы дали немного для понимания того, как действуют бактериофаги в природных условиях, а на каждую успешную попытку фаготерапии приходилось множество неудачных. На тот момент сведений о том, как выделять, характеризовать, культивировать и применять бактериофаги в медицине и в сельском хозяйстве было явно недостаточно.

Новый виток интереса к бактериофагам, произошедший в 1960–1970-х гг., был вызван удобством манипуляций с этими микроскопическими организмами. На примере бактериофагов были открыты и описаны многие фундаментальные процессы, составляющие ныне классику молекулярной биологии. Однако прикладному применению фагов внимания в то время уделялось значительно меньше, что и неудивительно

при тогдашнем тотальном доминировании антибиотиков для лечения бактериальных инфекций в медицине, ветеринарии и растениеводстве.

В основном такие эксперименты предпринимались в Японии – стране, не участвовавшей в первом этапе исследования фагов. И хотя в научной печати того времени встречается ряд успешных докладов о применении фаготерапии, в том числе и в сельском хозяйстве, попытки обобщить эти данные и выработать общую концепцию развития не увенчались успехом. Некоторые исследователи, более того, задавались вопросом: как вообще могли быть получены воспроизводимые положительные результаты? В условиях повсеместного внедрения в сельском хозяйстве антибиотиков и других химических агентов (например, соединений меди) использование фагов для лечения болезней растений казалось излишне сложным и малоперспективным.

С тех пор, несмотря на рост информации о строении, генетике и механизмах действия бактериофагов, интерес к ним в контексте их применения для лечения бактериозов растений остается на постоянном, относительно невысоком уровне. Ежегодно в микробиологических и сельскохозяйственных журналах публикуется несколько работ об успешных случаях фаготерапии того или иного сочетания «растение-патоген», предлагается состав фагового препарата, который иногда даже патентуется и производится промышленно (например, «Мультифаг» в Белоруссии и «Пентафаг-С» на Украине). Однако резонанс таких публикаций и коммерческий успех препаратов невелики, так как до сих пор нет ответов на многие логичные вопросы, задаваемые скептиками.



Всеми любимый картофель подвержен целому ряду бактериозов.

*Вверху:* картофель, пораженный черной ножкой, вызванной бактерией *Dickeya solani*; *внизу:* клубни, пораженные мягкой гнилью, вызванной бактерией *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Узкий спектр инфекционного действия фагов принципиально контрастирует с широким спектром антибиотиков. Существует обоснованное мнение, что если болезнетворный агент точно не определен, то фаги, скорее всего, не сработают. Поэтому чрезвычайно важным этапом использования фаготерапии является высокоточная диагностика патогена (до группы штаммов). Учитывая, что у растений схожие признаки болезни могут проявляться при инфицировании разными микробиологическими агентами, а методы сельскохозяйственной диагностики значительно менее развиты по сравнению с медицинской, это требование зачастую считается критическим ограничением.

Следующее ограничение – быстрая приспособляемость бактериальных патогенов. Оппоненты фаготерапевтических приложений всегда упоминают возможность того, что бактерия мутирует и станет устойчивой к индивидуальным фагам. Действительно, в классических экспериментах С. Луриа и М. Дельбрюка показано, что вероятность мутации, обуславливающей устойчивость к фагу, составляет около  $10^{-9}$ . То есть в любой крупной бактериальной популяции через короткое время обязательно появится мутант, который не будет инфицироваться этим бактериофа-

гом. Поэтому использование бактериофагов в большой экологической системе способно только затормозить развитие заболевания, но не остановить его полностью.

Еще один фактор, который надо учитывать, – сложность микробных сообществ. Помимо уже упомянутой возможности бактерий, различных по происхождению, вызывать заболевания со сходными симптомами, существует вероятность, что в инфекции участвует сразу несколько штаммовых групп одного или близких патогенов. Многие фитопатогены не изучены современными методами, и случаются ситуации, когда бактерии с одинаковым комплексом морфологических и биохимических свойств генетически достаточно сильно отличаются.

Например, вызывающая бактериальную пятнистость томатов и перца бактерия *Xanthomonas campestris* pv *Vesicatoria*, ранее считавшаяся отдельным видом, представляет собой смесь по крайней мере четырех разных видов, каждый из которых вносит свой вклад в развитие и проявление симптомов заболевания. В силу высокой специализации бактериофагов их применение против таких не охарактеризованных микроорганизмов с высокой вероятностью может закончиться неудачей.

Принято считать, что для успешной фаготерапии концентрация фага должна быть высокой. Действительно, для эффективного контроля фаги должны присутствовать в количестве, превышающем некий порог по отношению к целевой бактерии (*множественность инфекции*). В большинстве публикаций фигурируют цифры  $10^6$ – $10^8$  частиц/мл в зависимости от плотности популяции бактерий. При концентрации ниже этих величин терапевтическое действие будет незначительным. Однако производство препаратов бактериофагов с высокой концентрацией для опрыскивания полей будет, скорее всего, экономически неоправданным.

Кроме того, независимо от соотношения концентрации фага и бактерии, для успешного применения фаговых препаратов необходимо, чтобы целевой микроорганизм был физически доступен для фага. В экологической микробиологии имеется термин «пространственное убежище», под которым подразумевается первоочередной способ, с помощью которого микроорганизм скрывается от сторонней атаки. Популяции бактерий на поверхности растений (*филлосфере*) и в слое почвы, прилегающем к корневой системе (*ризосфере*), весьма неоднородны по своей плотности, а также способны физически перемещаться. Вирусы же не могут передвигаться самостоятельно, поэтому даже при высокой концентрации бактериофагов в препарате их проникновение внутрь тканей растения очень проблематично.

Отдельно нужно отметить уязвимость фаговых частиц. Полевые и лабораторные исследования показали, что вирусы инактивируются при высоких температурах,

высоких и низких показателях кислотности среды, а также под действием солнечной радиации, недостаточной или избыточной влажности. Таким образом, условия, естественные для филлосферы, оказываются губительными для фагов, и в течение короткого времени популяция бактериофага на обработанном растении резко уменьшается. При внесении бактериофагов в почву срок их циркуляции увеличивается, достигая нескольких дней, а небольшие размеры позволяют им вместе с потоком жидкости непосредственно проникать в сосудистую систему растений.

Но если фаг не найдет целевую бактерию, чтобы размножиться, то срок его «жизни» в коллоидном растворе будет ограничен. И хотя частицы бактериофагов полностью биоразлагаемы и не накапливаются в окружающей среде, как потерявшие активность антибиотики и химические средства защиты, короткий срок существования (*персистенции*) фага на поверхности растения и почве в естественных условиях является важным фактором, практически исключающим возможность их профилактического применения.

Перечисленные сложности, несомненно, объективны. Но настолько ли они непреодолимы, как представляют противники этого метода? Как правило, для каждой из этих высказанных проблем имеются свои пути решения.

## Решаем проблемы

Для преодоления узости инфекционного спектра фагов применяется предварительный скрининг, при котором проводится селекция фагов с более широким диапазоном действия или подбирается композиция нескольких фагов, покрывающая наиболее вероятный диапазон патогена или комплекса патогенов. Такой подход используется при компоновке медицинских фаговых препаратов – и тех, которые выпускаются много лет в России и Грузии, и тех, которые начали создаваться недавно в ряде стран мира. Иногда в стремлении охватить максимальное число возможных бактерий в препараты включают 30–40 разных бактериофагов.

Впрочем, такое решение имеет и обратную сторону: при наличии в одном препарате большого числа разных фагов в высокой концентрации возможно их взаимодействие между собой – агрегация, неспецифическая адсорбция, неспецифическая рекомбинация. По мнению многих исследователей, занимающихся созданием фаговых композиций, оптимальное число различных бактериофагов в препарате составляет 5–10 штаммов.

Сочетание в одном препарате нескольких фагов, поражающих один и тот же патоген, – важный шаг в направлении преодоления бактериальной устойчивости к бактериофагам. Механизмы возникновения подобной устойчивости у бактерий достаточно неплохо изучены,

## Пять «против»

Существует ряд фундаментальных ограничений, вытекающих из биологии взаимодействия вируса и его хозяина, которые осложняют проведение фаготерапии и служат основой для критики разной степени обоснованности.

Важнейшее ограничение бактериофагов – их высокая инфекционная специализация по отношению к бактериям-хозяевам. Каждый вид (клон, раса) бактериофагов инфицирует достаточно узкую группу штаммов внутри таксономического вида бактерий в зависимости от молекулы-рецептора на поверхности бактерии, к которой вирус присоединяется, адаптации к циклу обмена веществ бактерии-хозяина и ряда других факторов. Фаги, способные паразитировать на бактериях разных видов или родов, встречаются крайне редко, причем бактерии, инфицируемые такими фагами, обычно близкородственны.

так что можно даже проводить искусственную селекцию фагов против бактерий, возникших в результате наиболее вероятных мутаций.

Например, для бактерии наиболее быстрое и эффективное защитное решение состоит в «потере» или изменении рецептора, к которому присоединяется бактериофаг. Рецепторами могут служить различные молекулы на поверхности бактерий: белки *тилей* (половых ворсинок) и транспортных каналов, поверхностные полисахариды и пептидогликаны. Исключение этих молекул из обмена веществ бактериальной клетки часто оказывает сильное влияние на ее жизнеспособность: многократно отмечено, что фагоустойчивый мутант патогенной бактерии менее агрессивен, и микроорганизму-хозяину, в свою очередь, легче с ним справиться. Если же препарат будет содержать несколько фагов, использующих разные рецепторы, то, во-первых, вероятность возникновения мутанта, устойчивого ко всем фагам, снижается; во-вторых, образовавшийся мутант будет еще менее болезнетворным.

При всем колоссальном разнообразии микроорганизмов в природе в качестве значимых патогенов растений выступает большое, но все же ограниченное число бактерий и их штаммов. Для большинства из них уже разработана или принципиально возможна современная молекулярная диагностика (ПЦР и иммунохимическими методами). Несмотря на более высокую стоимость, такая диагностика точнее и быстрее по сравнению с традиционными микробиологическими методами. Поэтому организация регулярного микробиологического мониторинга или оборудование собственной диагностической лаборатории — оправданное решение для крупных сельскохозяйственных предприятий.

Подбор панели бактериофагов, способных инфицировать фитопатогены, которые наиболее часто встречаются на определенных культурах в определенной местности, — задача большая, но не бесконечная. В последние годы появился термин «персонализированная медицина», в том числе подразумевающая персонализированный подбор лекарственных средств с учетом возбудителя заболевания и состояния пациента.

В растениеводстве диагностика и обработка каждого растения практически невозможны. Однако если речь идет об обработке больших площадей на одной территории, засеянных одной культурой, с единым источником посевного материала, то в таких масштабах проведение диагностического мониторинга, подбор и производство фагового препарата, адаптированного именно под этот патоген, — вполне реалистичные действия, укладываемые в концепцию «наукоемкого сельского хозяйства».

Для поддержания необходимой концентрации фаготерапевтических агентов и увеличения времени действия фагового препарата в последние годы было

**В печати встречаются публикации о применении в растениеводстве «фаголизин» — фаговых белков-ферментов, разрушающих бактериальные клетки. Но эти результаты выглядят скорее как курьез, так как здесь беспорядком ограничивающим фактором служит довольно высокая стоимость рекомбинантных белков и необходимость в точечном нанесении подобных препаратов. И даже когда эффективность того или иного ферментного препарата доказана на нескольких экземплярах комнатных растений, трудно представить себе человека, гуляющего с кисточкой по бескрайнему картофельному или кукурузному полю в поисках мест поражения бактериальными патогенами**

предложено несколько остроумных решений. Довольно известным методом биологического контроля в растениеводстве и средством биоремедиации почвы служит применение непатогенных бактерий, как правило, родов *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Rhizobacterium* и *Pseudomonas*. При внесении в почву они служат антагонистами патогенных микроорганизмов, препятствуя их размножению и переносу инфекции на растения. Этот подход также имеет ряд фундаментальных ограничений, но достаточно успешно применяется в сельском хозяйстве.

По мере накопления знаний о биологии бактериофагов выяснилось, что некоторые из этих бактерий могут быть промежуточным хозяином для фагов, активных в отношении их близких патогенных «родственников». Литическая активность таких фагов существенно ниже, но зато их концентрация в ризосфере при одновременном внесении с бактериями-антагонистами будет дольше поддерживаться на постоянном уровне, чем при внесении одних только фагов.

Например, некоторые штаммы бактерии *Pantoea agglomerans*, служащие антагонистом патогенной для плодовых деревьев *Erwinia amylovora*, могут быть промежуточным резервуаром фагов, высоко инфекционных по отношению к этой бактерии. Эффект применения такого комбинированного препарата был сравним с действием стрептомицина (Balogh *et al.*, 2010). В другой работе описано успешное применение в почве неагрессивного штамма *Ralstonia* как промежуточного носителя фага против патогена пасленовых культур *R. solanacearum* (Fujiwara *et al.*, 2011). Дальнейшим развитием этого подхода может быть селекция фагов,

способных размножаться с низкой эффективностью на бактериях, входящих в нормальную флору почвы.

Для упрощения и удешевления использования как бактериофаги, так и бактерии-антагонисты обычно применяются в виде культуральных растворов. Однако при таком подходе достаточно сложно обеспечить необходимую концентрацию и жизнеспособность действующих агентов при хранении препарата.

В последнее время разработаны технологически и экономически эффективные методы заключения популяций бактерий и бактериофагов в полимерные капсулы, что стабилизирует биопрепарат и обеспечивает его постепенное высвобождение в ризосферу. Обработка посевного материала такими инкапсулированными препаратами обеспечит защиту от патогенов на ранних стадиях развития растения.

**Д**ля внедрения фагоконтроля заболеваний растений в современное сельскохозяйственное производство очень важно иметь четкое понимание, в каких агротехнических ситуациях применение бактериофагов может быть наиболее эффективным. Наибольший успех фаготерапии однозначно достигается в замкнутых биологических системах с контролируемыми физическими условиями. При полевом земледелии таких идеализированных условий добиться почти невозможно, что не исключает успешного применения фагопрепаратов и в этом случае.

Однако и для товарного производства, и, в особенности, для производства семенного материала наибольшую значимость в наши дни приобретает растениеводство в условиях теплиц на субстрате по-

стоянного состава, с применением капельного полива и гидропонии. В этих случаях применение фаговых препаратов против своевременно и точно диагностируемых патогенных бактерий, вызывающих болезни растений, полностью оправдано и может применяться с высоким шансом на успех.

Резюмируя все вышесказанное, можно утверждать, что для успешного внедрения бактериофагов с целью контроля и лечения бактериальных заболеваний в промышленное растениеводство принципиальных препятствий нет. Необходимо предпринять ряд шагов скорее технологического и методологического плана, чтобы этот перспективный подход стал неотъемлемой частью «зеленых агротехнологий».

*Литература*

Balogh B., Jones J.B., Iriarte F.B. *et al.* Phage therapy for plant disease control // *Cur. Pharmac. Biotechnol.* 2010. V. 11(1). P. 48–57.

Fujiwara A. *et al.* Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages // *App. and Envir. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 4155–4162.

Gill J.J., Hyman, P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy // *Cur. Pharmac. Biotechnol.* 2010. V. 11(1). P. 2–14.

Goodridge L.D. Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: Fact or fiction? // *Trends in Biotechnol.* 2004. V. 22(8). P. 384–385.

Jones J.B., *et al.* Bacteriophages for plant disease control // *Ann. Rev. of Phytopathol.* 2007. V. 45. P. 245–262.

В публикации использованы фотографии А.Н. Игнатова (Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Московская обл.) и рисунки Жени Власова