

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის  
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი, სამაგისტრო  
პროგრამა - გამოყენებითი ბიომეცნიერებები და ბიოტექნოლოგიები  
ანა ნიკოლეიშვილი

## ვირულენტური ბაქტერიოფაგების შერჩევა *Ralstonia* *Solanacearum*-ით გამოწვეული მცენარეთა ბაქტერიოზების ბიოლოგიური კონტროლისთვის

სამაგისტრო ნაშრომი შესრულებულია გიორგი ელიავას სახელობის  
ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში,  
გამოყენებითი ბიომეცნიერებების და ბიოტექნოლოგიების მაგისტრის  
აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად



ნაშრომის ხელმძღვანელი: თამარ ქოქაშვილი -  
ასისტენტ-პროფესორი, მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი;  
ნუნუ მიცკევიჩი- ასოცირებული პროფესორი, ბიოლოგიის მეცნიერებათა  
დოქტორი.

თბილისი

2024

## ანოტაცია

*Ralstonia solanacearum*-ი მსოფლიოში ყველაზე საშიშ ფიტოპათოგენებს შორისაა, იგი იწვევს მნიშვნელოვან ეკონომიკურ ზარალს, წამყვანი კულტურების ინფიცირებას, როგორც კარტოფილი, პომიდორი, ბანანი და სხვა. მისი გამძლეობა ნიადაგსა და წყალში, გენეტიკურ ცვალებადობასთან ერთად, ართულებს კონტროლს ისეთი მეთოდების გამოყენებისას, როგორც ანტიბიოტიკები და ქიმიური პესტიციდები. ამიტომ, ბაქტერიასთან საბრძოლველად, ძალზედ მნიშვნელოვანია ეფექტური და გარემოსთვის უსაფრთხო კონტროლის მეთოდის შემუშავება სოფლის მეურნეობაში.

წარმოდგენილი კვლევის ძირითადი მიზანია *Ralstonia solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების დეტალური დახასიათება და მათი პოტენციალის შეფასება, მცენარეთა ბაქტერიოზების ბიოლოგიური კონტროლისთვის.

ჩვენს ხელთ არსებული *Ralstonia solanacearum*-ის 40 იზოლატი გადამოწმდა ძირითად ბიოქიმიურ მახასიათებლებზე. რის შედეგადაც გამოვლინდა, რომ ყველა იზოლატი ბიოქიმიური მახასიათებლებით მსგავსი იყო *R. solanacearum*-ის ტიპური შტამის. შემდეგ უკვე შევაფასეთ 10 სხვადასხვა ანტიბიოტიკის მიმართ მგრძობელობა. დადგინდა, რომ *R. solanacearum*-ის შტამების რეზისტენტობა მაღალი იყო ამ ანტიბიოტიკების მიმართ კერძოდ: ცეფაზოლინი 100%, ამპიცილინი 97.5%, პოლიმიქსინი 97.5 %, გენტამიცინი 95 %, კანამიცინი 92.5%, სტრეპტომიცინი 92.5%. ამ მონაცემებით კიდევ ერთხელ ვრწმუნდებით, რომ აუცილებელია ბაქტერიებთან საბრძოლველად გამოყენებული იქნას უფრო ეფექტური საშუალება. ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით შევისწავლეთ *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 ბაქტერიოფაგის ვირიონის მორფოლოგია. კვლევაში გამოყენებული ფაგები მიეკუთვნება Myoviridae და Podoviridae ჯგუფს. შემდგომი კვლევის მიზანი იყო *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობის შეფასება, რის შედეგადაც დავადგინეთ, რომ 31 შტამი 40-დან ლიზირდებოდა ბაქტერიოფაგების ერთობლიობით (7 ბაქტერიოფაგით). რესტრიქციული პროფილის შედარებამ საშუალება მოგვცა გვემსჯელა საკვლევი ფაგების გენეტიკურ მრავალფეროვნებაზე. კერძოდ გამოიყო ხუთი სხვადასხვა ტიპის ფაგი. ამ შედეგებზე დაყრდნობით შეირჩა 3 (*R.s* 3-1; *R.s* 6-3; *R.s* 4) *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგი შემდგომი კვლევისთვის. შევისწავლეთ ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების ზეგავლენა შერჩეულ ფაგებზე, რის შედეგადაც

დადგინდა, რომ ეს ფაგები ხასიათდებიან მდგრადობით მაღალი ტემპერატურის და სხვადასხვა pH- ის პირობებში. ასევე შერჩეული ფაგები თხიერ არეში სტაბილურობას ინარჩუნებდნენ 24 საათი შემდეგ  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  განზავებაში.

მიღებული შედეგებიდან შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ შერჩეული *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური სამივე ფაგის, ფართო ლიზისური სპექტრი, ხანგრძლივი ლიზისური სტაბილობა თხიერ საკვებ არეში, ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორებისადმი მდგრადობა, აკმაყოფილებს ბიოლოგიური კონტროლისთვის გამოსაყენებელ ბაქტერიოფაგებისადმი წაყენებულ მოთხოვნებს.

## Annotation

*Ralstonia solanacearum* is among the most dangerous phytopathogens globally, causing significant economic losses by infecting major crops such as potatoes, tomatoes, bananas, and others. Its persistence in soil and water, coupled with genetic variability, complicates control measures using antibiotics and chemical pesticides. Therefore, it is crucial to develop effective and environmentally safe control methods for agriculture.

The main goal of the presented research is to characterize specific phages against *R. solanacearum* and assess their potential for biological control of plant bacterial diseases. We studied basic biochemical characteristics for 40 isolates of *R. solanacearum*, as a result, it was revealed that all the isolates were similar to the typical strain of *R. solanacearum* by biochemical characteristics. Subsequently, we evaluated the sensitivity of these isolates to 10 different antibiotics. It was determined that *R. solanacearum* strains were resistant to these antibiotics: cefazolin 100%, ampicillin 97.5%, polymyxin 97.5%, gentamicin 95%, kanamycin 92.5%, streptomycin 92.5%. These data reinforce the necessity for more effective means to combat the bacteria. We also studied the virion morphology of seven bacteriophages specific to *R. solanacearum* by electron microscopy. The phages belong to the Myoviridae and Podoviridae families. The subsequent objective was to assess the lytic activity of phages specific to *R. solanacearum*, which revealed that 31 out of 40 strains were lysed by a combination of seven bacteriophages. Restriction profile comparison allowed us to look at the genetic diversity of the study phages. Five different types of phages have been isolated. Based on these results, three phages (*R.s* 3-1; *R.s* 6-3; *R.s* 4) specific to *R. solanacearum* were selected for further research. We

studied the influence of physical and chemical factors on the selected phages, it was determined that these phages are characterized by stability at high temperature and different pH environments. Additionally, the selected phages maintained stability in liquid media for 24 hours at dilutions of  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , and  $10^{-3}$ .

From the obtained results, we can conclude that the broad lytic spectrum, long-term lysis stability in the liquid media, resistance to physical-chemical factors of the three selected *R. solanacearum*-specific phages meet the requirements for bacteriophages used in biological control.

## სარჩევი:

ანოტაცია .....	2
შესავალი .....	7
1 ლიტერატურის მიმოხილვა .....	9
1.1 <i>Ralstonia solanacearum</i> -ის დახასიათება.....	9
1.1.1 <i>Ralstonia solanacearum</i> მორფოლოგია, პათოგენეზი .....	9
1.1.2 კლასიფიკაცია .....	11
1.1.3 <i>Ralstonia solanacearum</i> -ის გავრცელების არეალი საქართველოში .....	12
1.1.4 <i>Ralstonia solanacearum</i> -ით გამოწვეული პათოგენეზი .....	12
1.1.5 ბაქტერიოზებთან პროფილაქტიკისა და ბრძოლის მეთოდები .....	13
1.2 ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური მრავალფეროვნება და კლასიფიკაციის მიმოხილვა.....	17
1.2.1 ბაქტერიოფაგების მახასიათებლები .....	17
1.3 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია.....	19
1.4 ბაქტერიოფაგის ურთიერთქმედება ბაქტერიულ უჯრედთან.....	20
2 მასალა და მეთოდოლოგია .....	21
2.1 საკვები არეები და ქიმიური რეაქტივები.....	21
2.2 <i>Ralstonia solanacearum</i> -ის შტამები .....	21
2.3 სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები <i>Ralstonia solanacearum</i> -ს მიმართ .....	22
2.4 ანტიბიოტიკები .....	22
2.5 კვლევაში გამოყენებული მეთოდები .....	22
2.5.1 <i>R. solanacearum</i> -ის ბიოქიმიური მახასიათებლების შესწავლა .....	22
2.5.2 ანტიბიოტიკომგრძობელობის განსაზღვრა კირბი-ბაუერის სტანდარტული დისკ-დიფუზიის მეთოდით .....	23
2.6 ბაქტერიული ვირუსების გამრავლების და კონცენტრირების, ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლის მეთოდები .....	24
3 კვლევის შედეგები და მათი განხილვა .....	27
3.1 <i>R. solanacearum</i> -ის შტამების ფენოტიპური დახასიათება .....	27
3.2 <i>R. solanacearum</i> -ის შტამების ანტიბიოტიკომგრძობელობის შესწავლა.....	31
3.3 ფაგის მორფოლოგიის შესწავლა ელექტრონული მიკროსკოპით .....	33
3.4 <i>R. solanacearum</i> -ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ლიზისური სპექტრის განსაზღვრა .....	34

3.5 <i>R. solanacearum</i> -ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი .....	36
3.6 <i>R. solanacearum</i> -ის მიმართ შერჩეული სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ლიზისური სტაბილობა თხიერ საკვებ არეში .....	39
3.7 <i>R. solanacearum</i> -ის ფაგების მგრძობელობა ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მიმართ .....	40
4 დასკვნა .....	42
5 გამოყენებული ლიტერატურა .....	42

## შესავალი

სტრატეგიული სასოფლო სამეურნეო კულტურების (ხორბალი, ბრინჯი სოიო, კარტოფილი, სტაფილო. ბანანი, ვაშლი, ციტრუსები და სხვ) დაავადებთან ბრძოლა დღემდე რჩება ერთერთ აქტუალურ პრობლემად მთელ მსოფლიოში, განსაკუთრებით, როცა დაავადება მასშტაბურ ხასიათს იღებს და მნიშვნელოვან ეკონომიკურ ზარალს იწვევს.

კარტოფილს მაღალი კვებითი ღირებულება აქვს და ის წამყვან კულტურას წარმოადგენს საქართველოს მაღალმთიანი რეგიონებისთვის (ქვემო ქართლი, სამცხე-ჯავახეთი, სვანეთი, მთიულეთი). კარტოფილის მაღალი და სტაბილური მოსავლის მისაღებად აუცილებელია მავნე მიკროორგანიზმებთან ბრძოლის ღონისძიებების გატარება, რასაც თავის მხრივ საფუძვლად უდევს რიგი აგროტექნიკური, ბიოლოგიური და ქიმიური ტექნოლოგიების კონბინირებული გამოყენება.

კულტურულ და ასევე ველურ მცენარეთა ერთ-ერთ მნიშვნელოვან დაავადებას წარმოადგენს მურა სიდამპლე, რომლის გამომწვევია *Ralstonia solanacearum*-ი (1). იგი აავადებს 50 სხვადასხვა მცენარეს, როგორც არის კარტოფილი, თამბაქო და პომიდორი. დაავადებისგან გამოწვეული დანაკარგები საკმაოდ მაღალია (30 - 70%) როგორც დიდ ფერმერულ მეურნეებში, ასევე საკარმიდამო ნაკვეთებზე. დაავადება შეიძლება მცენარის ზრდის ნებისმიერ ფაზაში გამოვლინდეს. *R.solanacearum* ავლენს მნიშვნელოვან მრავალფეროვნებას და კლასიფიცირებულია ოთხ ძირითად ფილოტიპურ ჯგუფად (ფილოტიპები), 5 რასასად და 5 ბიოვარად. *Ralstonia*-ს გვარის სახეობათა შორის ყველაზე მნიშვნელოვანია რასა 3, ბიოვარი 2. ეს რასა ფართოდ არის გავრცელებული მრავალ ქვეყანაში (დიდი ბრიტანეთი, ნიდერლანდები, შვედეთი და ა.შ) და განიხილება, როგორც საკარანტიონო ობიექტი - შეტანილია ევროპის მცენარეთა პათოლოგიის ორგანიზაციის (EPPO) ე.წ. A2 ნუსხაში, ასევე აგროკულტურათა ბიოტერორიზმის აგენტთა სიაში. პათოგენის დისემინაციის მრავალი გზა არსებობს: დაბინძურებული ნიადაგი, სარწყავი წყალი, ზედაპირული წყლები, დაავადებული მცენარის გადანერგვა, პერსონალის მიერ ინფიცირებული მცენარეთა ქსოვილების გადატანა და ა.შ. აქედან გამომდინარე, ამ დაავადების პრევენცია და მისი ერადიკაცია დიდ პრობლემას წარმოადგენს.

მიუხედავად იმისა, რომ ანტიბიოტიკები და სპილენძზე დაფუძნებული პესტიციდები ტრადიციულად ფართოდ გამოიყენება ფიტოპათოგენების ინჰიბირების მიზნით, მათი ეფექტურობა საგრძნობლად შემცირდა რეზისტენტული ბაქტერიული შტამების გავრცელების გამო. ამ რეალობამ ეკოლოგიური მიზანდასახულობის (გარემოსადმი მეგობრული, უვნებელი ტექნოლოგიები) მოთხოვნასთან ერთად ბოლო წლებში განსაკუთრებით გამოიკვეთა ალტერნატიული თერაპიული სტრატეგიების განვითარების და გამოყენების აუცილებლობა.

ასეთ საშუალებებში პირველყოვლისა მოიაზრება ბაქტერიოფაგები, რომელთა ანტიმიკრობული (სამკურნალო და პროფილაქტიკური) ეფექტურობა დამტკიცებულია მრავალწლიანი გამოცდილებით (2). ბოლო ორი ათწლეულების განმავლობაში გელაივას ინსტიტუტში ჩატარდა რიგი კვლევები, რომელთა ფარგლებშიც გამოიყო და ბიოლოგიურად დახასიათდა ბაქტერიოფაგები სხვადასხვა ფიტოპათოგენური ბაქტერიების მიმართ, მათ შორის *Ralstonia*-ს გვარის სახეობებზეც (3,4,5,6). მიზნად ისახავდა მნიშვნელოვანი ფიტოპათოგენური ბაქტერიების მიმართ სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგების გამოყენებას, მათ შორის უახლეს სამეცნიერო ლიტერატურაშიც გამოჩნდა პუბლიკაციები, რომლებიც ეხება ჩვენი სამიზნე - *Ralstonia* -ს გვარის - ბაქტერიების მიერ გამოწვეული ინფექციების კონტროლისათვის ფაგების და მათი ნარეგების გამოყენებას (7,8,9,10). ფაგური პრეპარატების, როგორც ახალი საშუალების, გამოყენება *R. solanacearum*-ით გამოწვეული კარტოფილის დაავადებების საწინააღმდეგოდ ემყარება ბაქტერიოფაგების მაღალ სპეციფიკურობას და ეკოლოგიურ უსაფრთხოებას.



# 1 ლიტერატურის მიმოხილვა

## 1.1 *Ralstonia solanacearum*-ის დახასიათება

### 1.1.1 *Ralstonia solanacearum* მორფოლოგია, პათოგენეზი

*Ralstonia solanacearum* ნიადაგსა და წყალში არსებული ბაქტერია, იგი გამომწვევია მცენარეებში ბაქტერიულ ჭკნობის, კარტოფილში მურა სიდამპლის. მისი მაღალი დესტრუქციული ხასიათის გამო მსოფლიოში მეორე ყველაზე მავნე ფიტოპათოგენია. 2010 წლის ივნისში პომიდვრის ნერგებზე ბაქტერიული ჭკნობის დაავადება საქართველოში პირველად დასავლეთ საქართველოს რეგიონში დაფიქსირდა ფერმერების მიერ, რამაც გამოიწვია მცენარის 100%-მდე დაკარგვა (11.) *R. Solanacearum* არის ღეროს ფორმის (ბაცილი), უჯრედების ზომა შეიძლება განსხვავდებოდეს, მაგრამ ზოგადად არის დაახლოებით 0,5-დან 1,5 მიკრომეტრამდე სიგანე და 1,5-დან 3 მიკრომეტრამდე სიგრძე. იგი მიეკუთვნება გრამ უარყოფით ბაქტერიებს, შესაბამისად, მასაც აქვს თხელი პეპტიდოგლიკანის ფენა უჯრედის კედელში, რომელიც მოთავსებულია გარე მემბრანასა და ციტოპლაზმურ მემბრანას შორის. განლაგება - ცალკეული ან წყვილი, ზოგჯერ ქმნის მოკლე ჯაჭვებს (12.) გააჩნია პოლარული შოლტი, ოქსიდაზა და კატალაზა დადებითი. იგი ითვლება მკაცრ აერობად და ახასიათებს აერობულ გარემოში ჟანგვითი მეტაბოლიზმის უნარი. ზოგიერთ შემთხვევაში, კი მას შეუძლია ნელი ზრდა, როცა უჯრედები პირდაპირ არ არიან კონტაქტში ჰაერთან. (13.) ტემპერატურა, რომელიც ბაქტერის სჭირდება ზრდა-განვითარებისთვის შესაძლებელია განსხვავებული იყოს სხვადასხვა რეგიონში, მაგალითად ტროპიკულ რაიონებში გავრცელებული *R. solanacearum*-ის შტამებს აქვს ზრდის მაღალი ტემპერატურა (35°C), ხოლო მაღალ მთიან და ზომიერი რაიონებში, ზრდის დაბალი ტემპერატურა (27 ° C). *R. solanacearum* არ გაიზრდება 4 ° C- ზე და 40 ° C-ზე. ზრდის მინიმალური 8-10 ° C და მაქსიმალური 37-39 ° C ტემპერატურული ზღვარია. როგორც ბაქტერიების უმრავლესობა, *R. solanacearum*-ის ზრდის ხელშემშლელი მჟავა გარემოა, ხოლო ტუტე გარემოში კი კარგად იზრდება (14). *R. solanacearum*-ის კოლონიების სპონტანური ტრანსფორმაცია ლორწოვანიდან არალორწოვან ფორმად არის შესამჩნევი მოვლენა, რომელიც დაკავშირებულია მათი პათოგენურობის შემცირებასთან. ეს გადასვლა, რომელსაც მოიხსენიებენ, როგორც

"ფენოტიპურ კონვერტაციას" (PC), შეინიშნება *R. solanacearum*-ის ყველა რასის შტამებში. PC აშკარა ხდება მყარ აგარზე კულტურის ხანგრძლივი თესვის დროს ან როდესაც მიკროორგანიზმი კულტივირებულია თხევად გარემოში, რომელიც შეიცავს ორგანულ აზოტის ნაერთებს და გლუკოზას, სადაც აირის ცვლა შეზღუდულია (15). ბაქტერიის კვლევა ტეტრაზოლიუმის ქლორიდის TZC-ზე იძლევა დიფერენცირებას ვირულენტულ და არავირულენტურ შტამებს შორის. ვირულენტური შტამები აგარის ფინჯანზე ქმნიან თეთრ კოლონიებს ვარდისფერი ცენტრებით, ხოლო არავირულენტური შტამები არის მუქი წითელი (16). ბაქტერია გადაადგილდება ცურვითი მოძრაობით. მოძრაობა მას ზრდის პერიოდში ახასიათებს. ცურვითი მოძრაობა დაკავშირებულია ბაქტერიის შოლტთან, მას შეუძლია წარმოქმნას ერთი ან ორი მოძრავი პოლარული შოლტი. *R. solanacearum* უჯრედებს მოძრაობა შეუძლიათ მაშინ, როდესაც სიმკვრივე უჯრედებისა  $>10^6$  და  $<10^9$  უჯ/მლ (17). ბაქტერიისთვის სწორედ მოძრაობის უნარი განაპირობებს, მცენარეში შეჭრას და კოლონიზაციას. რასა 1 და რასა 2- ის შტამები უფრო მოძრავნი არიან, ვიდრე რასა 3-ის შტამები (18).

ბაქტერიის ვირულენტური ფაქტორები დაავადების ხელშეწყობისთვის:

1. ეგზოპოლისაქარიდი (EPS): აწარმოებს ეგზოპოლისაქარიდებს, რომლებიც შაქრის რთული მოლეკულებია, ისინი ქმნიან დამცავ მატრიქსს ბაქტერიული უჯრედების გარშემო;

2. გენები, რომლებიც ხელს უწყობენ მოძრაობასა და ცურვას: აქვს გენები, რომლებიც კოდირებენ მოძრაობასა და ცურვაში ჩართულ ცილებს, როგორცაა შოლტი და პილები(ფიმბრიები). ეს სტრუქტურები საშუალებას აძლევს ბაქტერიებს გადაადგილდნენ მცენარის სისხლძარღვთა სისტემაში, რაც მათ საშუალებას აძლევს გავრცელდნენ ინფექციის საწყისი ადგილიდან მცენარის სხვა ნაწილებში(19);

3. ბაქტერიაში პათოგენების განმსაზღვრელი გენი (hrp) განაპირობებს როგორც დაავადების განვითარებას, ასევე ჰიპერმგრძობელობის რეაქციის დათრგუნვას მცენარეში. ჰიპერმგრძობელობის რეაქცია (HR) არის გადამწყვეტი დამცავი მექანიზმი, რომელსაც მცენარეები იყენებენ ბაქტერიულ პათოგენებთან საბრძოლველად. ჰიპერმგრძობიარე რეაქციის დროს, ინფექციის ადგილზე მცენარეული უჯრედები განიცდიან დაპროგრამებულ უჯრედულ სიკვდილს (PCD), რაც ზღუდავს პათოგენის

გავრცელებას მცენარის სხვა ნაწილებზე (20.) Hrp გენი გვხვდება ბაქტერიის მეგაპლაზმიდაში. სწორედ hrp აკოდირებს III ტიპის სეკრეციის სისტემის (T3SS) კომპონენტებს. Ralstonia იყენებს III ტიპის სეკრეციის სისტემას (T3SS) ეფექტური ცილების პირდაპირ მცენარის უჯრედებში შესაყვანად. ეს მოქმედი პროტეინები ხელს უწყობენ ბაქტერიების კოლონიზაციას, და მასპინძლის თავდაცვის ჩახშობას;

4. ფერმენტების სეკრეცია: გამოყოფს სხვადასხვა ფერმენტებს, რომლებიც გადამწყვეტ როლს ასრულებენ დაავადების პროგრესირების ხელშეწყობაში. მაგ: დნმ-აზები, უჯრედის კედლის დამშლელი ფერმენტები: ენდოკლუკონაზა (Egl),  $\beta$ -1,4-ცელობიოჰიდროლაზა (CbhA) და ზოგიერთი პექტინაზები (19).

### 1.1.2 კლასიფიკაცია

ბაქტერიული ჭკნობის ისტორია თარიღდება მე-19 საუკუნის ბოლოს, როდესაც სიმპტომები დაფიქსირდა მრავალ მცენარეულ მასპინძელზე. თუმცა, ადრეულ კვლევებს არ ჰქონდა პათოგენურობის მტკიცებულება და არ მოიცავდა გამომწვევი ორგანიზმის აღწერას. კარტოფილზე ჭკნობის დაავადება 1890 წელს TJ Burrill-მა აღწერა. პომიდვრის ბაქტერიული ჭკნობას მისისიპში 1891 წელს ბაირონ დ. ჰალსტედი აკვირდებოდა და სწავლობდა. შემდგომ, ერვინ ფრინკ სმიტმა მისივე კვლევების საფუძველზე ბაქტერია მიაკუთვნა Bacillus solanacearum-ს სახეობას. მოგვიანებით მიაკუთვნეს Pseudomonas გვარს. მან კვლავ განიცადა რეკლასიფიკაცია და მისი ბიოქიმიური, ფიზიკური და კვების თავისებურებების გათვალისწინებით 1995 წლიდან იგი განეკუთვნება ახალ შექმნილ გვარს Ralstonia-ს. დღევანდელი კლასიფიკაციით განეკუთვნება: კლასი Proteobacteriales, ქვეკლასი  $\beta$ - proteobacteria-ს, რიგი Burkholderiales, ოჯახი Ralstoniaceae, გვარი Ralstonia (21).

ფიტოპათოგენი მოიცავს ხუთ რასას და ხუთ ბიოვარს. რასები დაყოფილია იმის მიხედვით თუ რომელ მცენარეთა სახეობას ანადგურებს, ხოლო ბიოვარის დაყოფა დაფუძნებულია ზოგიერთი ნახშირწყლისა და სპირტების გამოყენების უნარზე.

**რასა 1-** ძალღერძებისებრთა ოჯახის მცენარეები, სხვადასხვა ოჯახის წარმომადგენლები: მიწის თხილი, მზესუმზირა, ლობიო და ზოგიერთი დეკორატიული მცენარე;

**რასა 2-** ბანანისებრთა ოჯახი;

რასა 3- პომიდორი,წიწაკა, კარტოფილი;

რასა 4-ჯანჯაფილი;

რასა 5-თუთის ხე (22).

### 1.1.3 *Ralstonia solanacearum*-ის გავრცელების არეალი საქართველოში

2011-2015 წლებში ჩატარდა კვლევები *R. Solanacearum* გავრცელების თაობაზე საქართველოში. კვლევამ ცხადყო, რომ ჩვენს ქვეყანაში საკმაოდ კარგად იყო გავრცელებული აღნიშნული წლებში ფიტოპათოგენი ბაქტერია და იგი გვხვდებოდა შემდეგ, გეოგრაფიულ ზონებში: 1. სამცხე-ჯავახეთი, სადაც კარტოფილის მურა სიდამპლე 63,6% შეადგენდა. 2. კოლხეთის დაბლობი, სადაც დაავადების გავრცელების ინტენსივობა იყო 48,54% და გვხვდებოდა მცენარეებზე როგორც არის: კარტოფილი, პომიდორი, წიწაკა, მაგრამ დაავადება ყველაზე მაღალი პროცენტით ფიქსირდებოდა კარტოფილზე- (62, 5%) და პომიდორზე- (48,48%). 3. ზემო აჭარა, სადაც ბაქტერიული ლპობის შემთხვევებმა შეადგინა- 43,13%. სადაც უდიდესი წილი მოდიოდა კარტოფილის მურა სიდამპლეზე (23).

### 1.1.4 *Ralstonia solanacearum*-ით გამოწვეული პათოგენიზი

**მურა სიდამპლე** - ფართოდ გავრცელებული კარტოფილის დაავადებაა, გამოწვეული *Ralstonia solanacearum* რასა 3-ით. დაავადების პირველი ნიშნები ვლინდება ყვავილობის პერიოდში. ბაქტერია მცენარეში იჭრება ფესვთა სისტემიდან დამატებითი ფესვების ჩამოყალიბებისას. მცენარეში მოხვედრილი ბაქტერია სწრაფად მრავლდება და ავსებს ჭურჭლებს, რაც დახშობას იწვევს. მცენარე ამის შემდეგ ვეღარ მარაგდება წყლითა და საკვები ნივთიერებებით,შესაბამისად ჭკნება.ინფექციის საწყის ეტაპზე, დღის ყველაზე ცხელ პერიოდში, ღეროს ზედა ნაწილში ფოთლები ჭკნება და ღამის პერიოდში საწყის მდგომარეობას უბრუნდება. ფოთლები მწვანე ფერს ინარჩუნებენ, მაგრამ მოგვიანებით ყვითლდება და ვითარდება მურა ნეკროზი.მცენარე საბოლოოდ ხმება. როდესაც დაავადებული მცენარის ღერო ტყდება ჭურჭელ-ბოჭკოვანი კონებიდან გამოიყოფა ლორწოვანი, რძისფერი ბაქტერიული ექსუდატი. როდესაც მოჭრილი ღერო წყალშია მოთავსებული, კარტოფილის ღეროდან ლორწო წარმოქმნის ძაფისებრ ნაკადებს, რომელიც *R.solanacearum* პირველად დიაგნოსტიკის საშუალებას წარმოადგენს, ვინაიდან კარტოფილის სხვა ბაქტერიული დაავადებისას ასეთი ძაფები

არ წარმოიქმნება. დაბალ ტემპერატურაზე შესაძლებელი არის განვითარდეს დაავადების უსიმპტომო ანუ ლატენტური ფორმა (24).

**ბაქტერიული ჭკნობა- *R. solanacearum*** აინფიცირებს და მრავლდება ფესვთა სისტემის სპეციალიზებულ წყალგამტარ სტრუქტურებში-ქსილემაში. წარმოქმნის წებოვან ნივთიერებას- ეგზოპოლისაქარიდს, რაც იწვევს ქსილემის ბლოკირებას, რაც თავის მხრივ იწვევს წყალგამტარი სისტემის დახშობას და მცენარე აღარ მარაგდება წყლით. ფოთლები ყვითლდება და შემდგომ ჭკნება. ამას მოჰყვება მცენარის უეცარი ჭკნობა მოკლე პერიოდში, მცენარე ველარ უბრუნდება საწყის მდგომარეობას და ხმება. დაავადების მოწინავე სტადიაზე, ინფიცირებული მცენარეების ღეროებში შეიძლება გამოვლინდეს ქსოვილის დეგრადაციის ნიშნები, რაც იწვევს ღეროების შიგნით ღრუების ან ღრუ სივრცეების წარმოქმნას. ბაქტერია აზიანებს ისეთ მნიშვნელოვან კულტურებს, როგორც არის: პომიდორი, წიწაკა და სხვა (19; 25).

### 1.1.5 ბაქტერიოზებთან პროფილაქტიკისა და ბრძოლის მეთოდები

ბაქტერიული დაავადებები, კარტოფილის წარმოების ერთ-ერთი მთავარი ბიოტური შეზღუდვაა, განსაკუთრებით ტროპიკულ და სუბტროპიკულ რეგიონებში და ზოგიერთ თბილ ზომიერ რეგიონებში. შვიდი ბაქტერიული დაავადება (*Clavibacter* spp., *Ralstonia* spp., *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp., *Streptomyces* spp., *Liberibacter* spp. და *Ralstonia solanacearum*) სერიოზულ გავლენას ახდენს კარტოფილის მოსავალზე მთელ მსოფლიოში და იწვევს ზიანს, განსაკუთრებით ტუბერებზე ანუ მცენარის ეკონომიკურად ყველაზე მნიშვნელოვან ნაწილზე. ყველაზე მნიშვნელოვან დაავადებათ, მაინც ბაქტერიული ჭკნობა და მურა სიდამპლე ითვლება (26).

1) შერჩევას აუცილებელია მეზობელი ტერიტორიების შესწავლაც, აღნიშნულ ადგილებს არ უნდა ჰქონდეთ ბაქტერიული ჭკნობის დაავადების წინა ისტორია, რადგან ეს ამცირებს პათოგენის მოსავლში მოხვედრის რისკს. ბაქტერიული ჭკნობა, გამოწვეული ისეთი პათოგენებით, როგორცაა *Ralstonia solanacearum*, შეიძლება გაგრძელდეს ნიადაგში და მცენარეულ ნარჩენებში დიდი ხნის განმავლობაში. ბრტყელი და კარგად დრენაჟირებული ნიადაგის შერჩევა ხელს უწყობს წყლის სწორად მართვას, რადგან ჭარბი ტენიანობა ხელსაყრელ პირობებს ქმნის ბაქტერიული პათოგენებისთვის. ნესტიანი ნიადაგების ან ჭარბი ტენიანობის მქონე ტერიტორიების თავიდან აცილება კიდევ უფრო ამცირებს დაავადების განვითარების რისკს, რადგან ეს პირობები ხელსაყრელია ბაქტერიული პათოგენების გავრცელებასა და

გამრავლებისათვის . გარდა ამისა, სხვა ინფიცირებული მინდვრებიდან წყლის თავისუფალი ჯვარედინი ნაკადის მქონე ტერიტორიების თავიდან აცილება ხელს უწყობს ბაქტერიული ჭკნობის პათოგენების შეყვანას კულტივირების ადგილზე. დაბინძურებულ წყალს შეუძლია პათოგენის გადატანა დიდ დისტანციებზე, რაც იწვევს დაავადებული ტერიტორიიდან, დაავადებისაგან თავისუფალი ტერიტორიის პოტენციურ დაბინძურებას.

2) მცენარეთა პათოგენები შეიძლება იყოს ინსტრუმენტებსა და მოწყობილობებზე წინა გამოყენების შემდეგ. ამიტომაც, რეკომენდებულია მოსავლის აღებისთვის განკუთვნილი ხელსაწყოების და აღჭურვილობის გაწმენდა გამოყენებამდე.

3) უნდა შეირჩეს კომერციულად ხელმისაწვდომი, სუფთა და სერთიფიცირებული ორგანულად წარმოებული კარტოფილის ტუბერები. ბაქტერიული ჭკნობის კონტროლი შესაძლებელი არის თესლის ტუბერების ცხელ ჰაერზე (112 °F) 75% ფარდობითი ტენიანობით: 30 წუთის განმავლობაში.

4) მწკრივების მანძილის გაზრდამ შესაძლებელია შეამციროს ბაქტერიული დაავადების სიხშირე ნიადაგში პათოგენების დაბალი პოპულაციებით. მცენარეთა რეკომენდებული მანძილი ჭკნობის სიხშირის შესამცირებლად 1,5-დან 2,5 ფუტამდე არის.

5) პესტიციდების მსოფლიო გამოყენებამ 2021 წელს მიაღწია 3,54 მილიონ ტონას. 1995 წლიდან მოყოლებული ყოველწლიურად 0,5%-ით იზრდება მათი მოხმარება. ჩინეთი პესტიციდების უმსხვილესი მომხმარებელია, 2021 წელს 1,8 მილიონი ტონა მოიხმარეს. მეორე, მესამე და მეოთხე ადგილებზე, შეერთებული შტატები, ბრაზილია და არგენტინა არის.

ჰექტარზე მოსავლის 1%-იანი ზრდა დაკავშირებულია პესტიციდების მოხმარების 1.8%-ით ზრდასთან.

პესტიციდები, კერძოდ ალგიციდი (3-[3-ინდოლილ] ბუტანონის მჟავა), ფუმიგანტები (მეტამ ნატრიუმი, 1,3-დიქლოროპროპენი და ქლოროპიკრინი) და მცენარეთა აქტივატორები, რომლებიც ქმნიან პომიდორზე სისტემურ რეზისტენტობას (ვალიდამიცინი A და ვალიდოქსილამინი) გამოიყენება ბაქტერიულ ჭკნობის საწინააღმდეგოდ . მეთილის ბრომიდის, 1,3-დიქლოროპროპენის ან მეტამ ნატრიუმის კომბინაციამ ქლოროპიკრინთან საგრძნობლად შეამცირა ბაქტერიული ჭკნობა

მინდორში 72%-დან 100%-მდე და გაზარდა მოსავლიანობა. პესტიციდებით დამუშავებული პომიდვრის მოსავლიანობა იყო 1,7-დან 2,5-ჯერ მეტი, ვიდრე დაუმუშავებელი კონტროლის.

ბაქტერიციდები (ტრიაზოლოთიადაზინი [0,5-დან 12 მმ-მდე, ხსნარში], სტრეპტომიცინის სულფატი [400 მგ კგ<sup>-1</sup> ნიადაგი] ( 72 )), სხვა ქიმიკატები, როგორცაა მათეთრებელი ფხვნილები, ან სუსტი მჟავე ელექტროლიზებული წყალი (40 ppm ხელმისაწვდომი ქლორი, pH 5.6 ხსნარში), ასევე ეფექტურად ანადგურებს მიკროორგანიზმებს.

Acibenzolar-S-methyl (ASM) და თიმოლის კომბინაციამ მნიშვნელოვნად შეამცირა დაავადების სიხშირე და გაზარდა მოსავლიანობა. თიმოლი არის ბუნებრივი ნაერთი ანტიმიკრობული თვისებებით. ASM-თან ერთად გამოყენებისას მკვლევარებმა დააფიქსირეს სინერგიული ეფექტი, რის შედეგადაც მნიშვნელოვნად მცირდება ისეთი დაავადებების შემთხვევები, როგორცაა ბაქტერიული ჭკნობა, მურა სიდამპლე ან გვიანი ჭინჭრის ციება კარტოფილში.

სილიციუმის დიოქსიდის (Si) და ქიტოზანის გამოყენება კარტოფილში ბაქტერიული დაავადების წინააღმდეგ. ცნობილია, რომ სილიციუმი და ქიტოზანი აძლიერებენ მცენარის უჯრედის კედლებს და ააქტიურებენ თავდაცვის მექანიზმებს როდესაც გამოიყენება კარტოფილის მცენარეებზე.

მცენარეთა დაავადების კონტროლი დიდწილად დამოკიდებული პესტიციდების გამოყენებაზე, მაგრამ უნდა ვიცოდეთ, რომ პესტიციდების უმრავლესობა შეიძლება დარჩეს გარემოში მრავალი წლის განმავლობაში, გახდეს დამაბინძურებელი ნიადაგში და/ან მიწისქვეშა წყლებში და იყოს მომწამვლელი ადამიანებისა და ცხოველებისთვის ( 27).

ანტიბიოტიკები მცენარეთა სოფლის მეურნეობაში ყველაზე რეგულარულად გამოიყენება ხუთი ანტიბიოტიკი: სტრეპტომიცინი, კასუგამიცინი , ოქსოლინის მჟავა , ოქსიტეტრაციკლინიც და გენტამიცინი. ანტიბიოტიკების გამოყენება მცენარეებზე განაპირობებს შერჩევით ზეწოლას მცენარეებთან ასოცირებულ ბაქტერიებზე, რამაც შესაძლებელია გამოიწვიოს ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის განვითარება. ბაქტერიებში ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის გაჩენა და გავრცელება შეიძლება

მოხდეს სხვადასხვა მექანიზმით, მათ შორის სპონტანური გენის მუტაციებით და გენის ჰორიზონტალური გადაცემით.

1. **სპონტანური გენის მუტაციები:** ბაქტერიებს შეუძლიათ განიცადონ სპონტანური მუტაციები თავიანთ გენეტიკურ მასალაში, განსაკუთრებით გენებში, რომლებიც დაკავშირებულია ანტიბიოტიკების მოქმედების მექანიზმთან. ამ მუტაციებმა შეიძლება მიანიჭოს რეზისტენტობა ანტიბიოტიკის მიმართ.
2. **გენის ჰორიზონტალური გადაცემა:** გენეტიკური მასალის ჰორიზონტალურად გადატანა შესაძლებელია ბაქტერიებს შორის რამდენიმე მექანიზმით:
  - ტრანსფორმაცია, ბაქტერიებს შეუძლიათ აიღონ თავისუფალი დნმ-ის მოლეკულები უჯრედ გარე გარემოდან და ჩაერთონ მათ გენომში, შეიძინონ ახალი გენეტიკური თვისებები, როგორცაა ანტიბიოტიკების წინააღმდეგობის გენები;
  - ტრანსდუქცია, იგი გულისხმობს გენეტიკური მასალის გადაცემას ბაქტერიოფაგების მიერ;
  - კონიუგაცია, მოითხოვს უშუალო კონტაქტს ორ ბაქტერიულ უჯრედს შორის, რომლის დროსაც გენეტიკური მასალა, რომელიც ხშირად პლაზმიდებზეა, გადადის დონორის უჯრედიდან მიმღებ უჯრედში.

მცენარეთა დაცვაში შესაძლებელია, უფრო მეტი ანტიბიოტიკი იქნას გამოყენებული, მაგრამ მათი ეფექტურობა კარგად არ არის შესწავლილი. გარდა ამისა, ზოგიერთ ქვეყანაში ისეთი ანტიბიოტიკები გამოიყენება მცენარეებზე, რომლებიც არ არიან ავტორიზებული. კიდევ ერთი პრობლემაა მონიტორინგის სისტემის არარსებობა ან/და ნაკლებობა რამაც შეიძლება გამოიწვიოს ანტიბიოტიკების არასათანადო ან გადაჭარბებული გამოყენება, რაც, თავის მხრივ, ხელს შეუწყობს ბაქტერიებში ანტიბიოტიკო რეზისტენტობის განვითარებას. მცენარეთა დაავადებებთან საბრძოლველად ახალი ანტიბიოტიკების ძიება კვლავაც აქტუალური საკითხია (28).

ბაქტერიოფაგების გამოყენება- ერთ-ერთი საუკეთესო გზაა ბაქტერიებთან საბრძოლველად ვინაიდან ძალზედ სპეციფიკური ვირუსებია, რომლებიც აინფიცირებს მხოლოდ კონკრეტულ ბაქტერიულ შტამებს, რის შედეგადაც არასამიზნე ორგანიზმები უვნებელია; იგი პესტიციდების მსგავსად არ ტოვებს მავნე ნარჩენებს და გარემოს არ აზინძურებს; ანტიბიოტიკებისა და ქიმიური პესტიციდების მიმართ რეზისტენტულ ბაქტერიებთან ბრძოლის საშუალებას წარმოადგენს; მას ახასიათებს სწრაფი ზრდა და



ბაქტერიების სწრაფი ლიზისი; შესაძლებელია შეიქმნას ფაგის კოქტილები, რითაც ბაქტერიების რამდენიმე შტამის განადგურებას შეძლებს.

## 1.2 ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური მრავალფეროვნება და კლასიფიკაციის მიმოხილვა

### 1.2.1 ბაქტერიოფაგების მახასიათებლები

ბაქტერიოფაგები (ბერძ. bacterio ჩხირი, phagos-მშთანთქმელი) პირველად 1915 წელს დიდ ბრიტანეთში აღმოაჩინა უილიამ ტორტმა, ხოლო 1917 წელს საფრანგეთში ფელიქს დ'ჰერელმა გააცნობიერა, რომ მათ ბაქტერიების მოკვლის პოტენციალი ჰქონდათ. დ'ჰერელმა გამოიგონა ტერმინი ბაქტერიოფაგი, რაც ნიშნავს „ბაქტერიების მჭამელს.“ კვლევები და ბაქტერიოფაგების გამოყენების პრაქტიკა გაგრძელდა ზოგიერთ ქვეყანაში, მათ შორის საქართველოში. არსებობს ათასობით სახეობის ფაგები, რომელთაგან თითოეულმა შეიძლება დაინფიციროს მხოლოდ ერთი ან რამდენიმე ტიპის ბაქტერია. მონოვალენტურია ფაგი, რომელიც იწვევს ერთი სახეობის ბაქტერიის ლიზის, ხოლო პოლივალენტური რამდენიმე სახეობას ანადგურებს. ფაგები კლასიფიცირდება ვირუსების რიგ ოჯახებში; მაგალითად: Microviridae, Inoviridae, Rudiviridae და Tectiviridae. ყველა ვირუსის მსგავსად, ფაგებიც მარტივი ორგანიზმებია, რომლებიც შედგება გენეტიკური მასალისგან (ნუკლეინის მჟავა), რომელიც გარშემორტყმულია ცილის კაფსიდით. ნუკლეინის მჟავა შეიძლება იყოს დნმ ან რნმ და შეიძლება იყოს ორჯაჭვიანი ან ერთჯაჭვიანი. არსებობს ფაგის სამი ძირითადი სტრუქტურული ფორმა: იკოსაედრული თავი კუდით, იკოსაედრული თავი კუდის გარეშე და ძაფისებრი ფორმა (29).

ბაქტერიოფაგის ტიპური სტრუქტურა შედგება თავის, კაფსიდისა და კუდისგან, თუმცა შეიძლება ჰქონდეთ დამატებითი სტრუქტურებიც, როგორცაა ფიბრილები, საყელო, ბაზალური ფირფიტა. ბაქტერიოფაგებს შორის, Escherichia virus T4 არის ერთ-ერთი ყველაზე ფართოდ შესწავლილი (30).

ბაქტერიოფაგის კვლევაში ქართველმა მეცნიერმა, გიორგი ელიავამ უდიდესი წვრილი შეიტანა, მან 1915 წელს Vibrio cholerae-ს თვითლიზისის მოვლენა შენიშნა და

შეისწავლა ბაქტერიოფაგის ფენომენი. მის სახელს ატარებს საქართველოში

ბაქტერიოფაგის მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი.

სხვა ვირუსების მსგავსად, ბაქტერიოფაგებიც ობლიგატური პარაზიტები არიან. ისინი გვხვდება ყველგან: ნიადაგში, ატმოსფეროში, წყალში, განსაკუთრებით კი საკანალიზაციო წყლებში, საჭმლის მომწელებელ სისტემაში, სხეულის ზედაპირზე, და ა.შ. 1 მილილიტრ სუფთა წყალში ბაქტერიოფაგის  $2 \times 10^8$  ნაწილაკებია. რაოდენობრივად ბაქტერიოფაგები ყველაზე გავრცელებული ბიოლოგიური ელემენტები არიან დედამიწაზე; დაახლოებით  $10^{30} - 10^{32}$  ფაგური ნაწილაკია. ამიტომაც, მათ სამართლიანად უწოდებენ, როგორც ეკოსისტემებში მიკრობული ბალანსის ძირითად მარეგულირებლებს.

სასიცოცხლო ციკლის მიხედვით ფაგები შეიძლება კლასიფიცირდეს: ლითიური, ლიზოგენური და ქრონიკული ფაგები. ლითიური ბაქტერიოფაგები, როგორცაა T4 და MS2, ათავსებენ საკუთარ გენეტიკურ მასალას ბაქტერიის შიგნით, რის შედეგადაც წარმოიქმნება დიდი რაოდენობის ბაქტერიოფაგის ასლები. რეპლიკაციის შემდეგ მემბრანა იშლება და თავისუფლდება ახალი ბაქტერიოფაგები. ლიზოგენურ ციკლში, ფაგები, როგორცაა T1, აერთიანებენ თავიანთ დნმ-ს ბაქტერიულ ქრომოსომაში და ხდება არაინფექციური პროფაგი. პროფაგი მრავლდება ბაქტერიულ გენომთან ერთად უჯრედების გაყოფის დროს. გარკვეულ პირობებში, პროფაგს შეუძლია ბაქტერიული ქრომოსომიდან ამოკვეთა და ლითიურ ციკლში გადასვლა, რაც ახალი ფაგის ნაწილაკების წარმოქმნას განაპირობებს. ქრონიკული ბაქტერიოფაგები (როგორცაა M13) ინარჩუნებენ თავიანთ გენომს ბაქტერიულ უჯრედში, უჯრედების დაუყოვნებელი ლიზისის გარეშე. მასპინძლის გათავისუფლება ხდება თანდათანობით, უჯრედის ნაკლები დაზიანებით, რაც საშუალებას აძლევს უფრო დიდხანს დარჩეს იქ (31).

პროკარიოტულ ვირუსებს, გააჩნიათ უნიკალური ორგანოები ბაქტერიულ უჯრედებზე მისამაგრებლად. ბაქტერიოფაგების უმრავლესობას გააჩნია ორჯაჭვიანი დნმ, მაგრამ არსებობს ასევე ერთჯაჭვიანი ან ორჯაჭვიანი რნმ-ის ან ერთჯაჭვიანი დნმ-ის მქონე ფაგები. ფაგის დნმ ან რნმ განთავსებულია კაფსიდში (32).

რაც შეეხება ფაგების მდგომარეობას, არსებობს სამი ტიპის მდგომარეონა:

არაუჯრედული მდგომარეობა ეხება თავისუფალ, მომწიფებულ ფაგის ნაწილაკებს, რომლებიც მასპინძელი უჯრედის გარეთ არიან და შეუძლიათ მასპინძელი უჯრედების დაინფიცირება.

ვეგეტატიური მდგომარეობა, როგორც წესი, ეხება ფაგის მდგომარეობას, როდესაც ის აქტიურად მრავლდება მასპინძელ უჯრედში და წარმოქმნის ახალ თაობას. ეს მდგომარეობა დამახასიათებელია ლითიური ფაგებისთვის.

პროფაგური მდგომარეობა ამ მდგომარეობაში ფაგის გენომი ინტეგრირებულია მასპინძელ ქრომოსომაში და მასთან ერთად განიცდის რეპლიკაციას. პროფაგი რჩება მიძინებული მასპინძლის გენომში გარკვეული პერიოდის განმავლობაში (33).

### 1.3 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ბაქტერიოფაგები ავლენენ მორფოლოგიურ მრავალფეროვნებას. ისინი კლასიფიცირებულნი არიან როგორც მორფოლოგიური ტიპის მიხედვით ასევე, ნუკლეინის მჟავების შემცველობით. ცნობილია ფაგის 10 ოჯახი და 8 გვარი.(34)

მართლაც, მიუხედავად იმისა, რომ მორფოლოგიური კრიტერიუმები იძლევა ღირებულ ინფორმაციას, მხოლოდ ისინი შეიძლება არ იყოს საკმარისი ბაქტერიოფაგების ზუსტი კატეგორიზაციისთვის. ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტი გვთავაზობთ ვირიონის და მისი ნუკლეინის მჟავების დამატებითი მახასიათებლების გათვალისწინებას ზუსტი კლასიფიკაციას. ეს კრიტერიუმები მოიცავს: ფიზიოლოგიური ტესტები და ლიზისური აქტივობის დიაპაზონი,მოლეკულური მასა, ნუკლეინის მჟავის პროპორცია და ნუკლეინის მჟავის კონფიგურაცია,სეროლოგიური მახასიათებლები და ინფორმაცია ნუკლეინის მჟავას ჰიბრიდიზაციის შესახებ, მოლეკულური მასა, დალექვის მახასიათებლები, ვირიონის ფორმა და ზომა.

გენომში ჰომოლოგიური რეგიონები გადამწყვეტ როლს თამაშობენ ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაციაში. ბაქტერიოფაგის რესტრიქციული პროფილის და სტრუქტურული ცილების შესწავლაც კლასიფიკაციის დადგენის მთავარი პირობაა (35).

ბაქტერიოფაგების დიფერენცირების ერთ-ერთ მეთოდს წარმოადგენს რესტრიქციული ენდონუკლეაზების ანალიზი. თუ ორი ფაგი ავლენს მსაგვსებას, შეგვიძლია ვივარაუდოთ რომ მათ აქვთ ნათესავური კავშირი (36).

## 1.4 ბაქტერიოფაგის ურთიერთქმედება ბაქტერიულ უჯრედთან

ბაქტერიოფაგისა და ბაქტერიული უჯრედის ურთიერთქმედება არის ძალზედ სპეციფიკური, მას სტადიური თანმიმდევრობა გააჩნია :

1. **ადსორბცია-** ბაქტერიოფაგი ემაგრება ბაქტერიის ზედაპირზე არსებულ სტრუქტურაზე რომელიც მოქმედებს როგორც რეცეპტორი. იგი განლაგებულია ან ლიპოპოლისაქარიდულ ან ლიპოპროტეინულ შრეში. ფაგის ადსორბცია ვერ მოხდება თუ ბაქტერიას არ გააჩნია უჯრედის კედელი. გარდა რეცეპტორისა ადსორბციის ასევე მნიშვნელოვანია ტემპერატურა, pH და სხვა ფაქტორები. ადსორბცია მიმდინარეობს ბაზალური მემბრანისა და მასზე არსებული შვერილებისა და წანაზარდების დაკავშირებით მასპინძელი უჯრედის კედელთან. წანაზარდებით და შვერილებით ეჭიდება ბაქტერიულ უჯრედს, ხოლო ფიქსაციას ბაზალური მემბრანით ახერხებს.
2. **ფაგის დნმ-ის შესვლა უჯრედში-** მეორე ეტაპია, ხდება ბაზალური მემბრანიდან ლიზოციმის გამოსვლა, იგი შლის უჯრედის კედელს, კონკრეტულად იმ ადგილზე სადაც დაკავშირებულია ფაგი. ამავე დროს ხდება კუდის შალითთან კალციუმის იონების გამოსვლა, რის შედეგადაც აქტიურდება ფერმენტი ატფ-აზა და მისი საშუალებით შალითა ატფ-ის გამოყენებით იკუმშება და შეჰყავს კუდის ღერძი ბაქტერიულ უჯრედში.
3. **ფაგის რეპროდუქცია -** ფაგის დნმ, როგორც კი უჯრედში მოხვდება იწყებს მთელი უჯრედის მეტაბოლიზმის გარდაქმნას საკუთარ თავზე. შესვლიდან 2-30წუთის განმავლობაში ფაგი არ ავლენს მოქმედებას ამ პერიოდს ლატენტური პერიოდი ეწოდება. შემდგომ კი იწყება ფაგის დნმ-ის რეპლიკაცია და მისივე ცილების სინთეზი.
4. **აწყობა-** ბაქტერიის უჯრედის სხვადასხვა უბანში სინთეზირდება ფაგის ნაწილები: კუდი, თავი, დნმ და სხვა. გაერთიანდებიან და იქმნება ახალი ფაგები.

5. **გამოსვლა-** აწყობის დასრულების შემდგომ ხდება ფაგების გამოსვლა მასპინძელი უჯრედიდან, რომელიც შემდგომ ილუპება, ლიზირდება ბაქტერიული უჯრედები და კვდება.

გარდა ამისა, არსებობს ლიზოგენური ციკლი, რომლის დროს რედუქცია ხდება ფაგის : ფაგის დნმ არ იწვევს ნუკლეინის მჟავებისა და ვირუსპეციფიკური ცილების სინთეზს. იგი ჩაერთვება ბაქტერიულ ქრომოსომაში და ასე გადაეცემა ბაქტერიულ შვილეულ თაობებს, ამ დგომარეობას ეწოდება პროფაგი (29).

## 2 მასალა და მეთოდოლოგია

### 2.1 საკვები არეები და ქიმიური რეაქტივები

*თხევადი, ნახევრად თხევადი და მყარი საკვები არეები ბაქტერიების და ბაქტერიოფაგების შენახვისა და კულტივირებისთვის:*

- სოიოს აგარი და ბულიონი (“Difco”, “Biomereux”);
- ჰიუ-ლეივსონის გლუკოზინი აგარი;
- მიულერ-ჰილტონის (Muller-Hinton) აგარი.
- 0%, 1%, 4%, 6 % მარილის შემცველ სოიოს ბულიონი.
- 3% წყალბადის ზეჟანგი
- ოქსიდაზას რეაგენტი
- ვაზელინის ზეთი
- დნმ-ის გამოსაყოფი ნაკრები (QIAamp® DNA Mini Kit (50)
- რესტრიქციული ფერმენტები(ენდონუკლეაზები SalI, EcoRI, EcoRV, HindIII, BglI, XhoI, XbaI).

### 2.2 *Ralstonia solanacearum*-ის შტამები

კვლევის ობიექტს წარმოადგენს საქართველოს სხვადასხვა გეოგრაფიულ ზონაში და სხვადასხვა დროს გავრცელებული მცენარეთა ბაქტერიული სიდამპლით დაავადებული ნიმუშებიდან გამოყოფილი მიკროორგანიზმი *Ralstonia solanacearum*-ის 40 იზოლატი, რომელიც ინახებოდა გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოლოგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის კოლექციაში.

## 2.3 სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები *Ralstonia solanacearum*--ს მიმართ

კვლევისთვის გამოყენებულ იქნა *Ralstonia solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 ბაქტერიოფაგი R.s 2-2, R.s 3-1, R.s 4, R.s 5, R.s 6, R.s 6-3, R.s 455. რომელიც ასევე ინახებოდა გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოლოგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის კოლექციაში.

## 2.4 ანტიბიოტიკები

კანამიციინი 30  $\mu$ გ, ციპროფლოქსაცინი 5  $\mu$ გ, ქლორანფენიკოლი 30  $\mu$ გ, ამპიცილინი 10  $\mu$ გ, სტრეპტომიციინი 10  $\mu$ გ, გენტამიციინი 10  $\mu$ გ, ტეტრაციკლინი 30  $\mu$ გ, სულფამეთოქსაზოლი 100  $\mu$ გ, პოლიმიქსინ-B 300 IU , ცეფაზოლინი 30  $\mu$ გ.

## 2.5 კვლევაში გამოყენებული მეთოდები

### 2.5.1 *R. solanacearum*-ის ბიოქიმიური მახასიათებლების შესწავლა

*Ralstonia solanacearum*-ის ფენოტიპური მახასიათებლების შესასწავლად გამოყენებული იყო სხვადასხვა ბიოქიმიური ტესტები.

**KOH- ის ტესტი :** ბაქტერიოლოგიური მარყუჟით ვილებდით ბაქტერიის 24 სთ--იან კულტურას და ვაკეთებდით ნაცხს სასაგნე მინაზე. ვაწვეთებდით 3%-იან KOH-ის წვეთს და ვაკვირდებოდით ლორწოს წარმოქმნას.

**ოქსიდაზა ტესტი:** ეს ტესტი გამოიყენება, როგორც წესი ფსევდომონადების ოჯახის დიფერენციისათვის სხვა ტიპის ჩხირებისაგან. ვატარებდით *R. solanacearum*-ის ახალგაზრდა კულტურაზე. ფილტრის ქაღალდზე ვაწვეთებდით ოქსიდაზას რეაგენტს და მარყუჟით ბაქტერიული კულტურა გადაგვქონდა ფილტრის ამ ნაწილზე. 30 წმ-ის განმავლობაში ვაკვირდებოდით შედეგს.

**კატალაზა ტესტი:** ჩავატარეთ ახალგაზრდა კულტურებზე (18-24 სთ). 3%-იან წყალბადის ზეჟანგს ( $H_2O_2$ ) ვაწვეთებდით სტერილურ მინის სასაგნე დაფაზე, რომელშიც ბაქტერიული მარყუჟით შეგვქონდა ბაქტერია. შევურევდით და ვაკვირდებოდით ბუშტების წარმოქმნის პროცესს.

**გლუკოზის ფერმენტაცია/ოქსიდაცია.** ტესტი გამოიყენება აერობულ და ანაერობულ პირობებში შაქრებიდან მჟავას წარმომქმნელ გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების

საიდენტიფიკაციოდ. ჰიუ-ლევისონის გლუკოზიან ნიადაგის ორ სინჯარაში (pH 7.0-7.1) ყოველ იზოლატისათვის ჩხვლევით ვახდენდით ჩათესვას. ერთ სინჯარას ვასხავდით სტერილური მინერალური ზეთს, რათა შეგვექმნა ანაერობული პირობები. მეორეში არ ვამატებდით ზეთს. დადებითი პასუხის დეტექცია ხდებოდა ფერის ცვლილებით იისფერიდან ყვითელში, რაც გამოწვეული იყო ნახშირწყლებიდან მჟავის წარმოქმნით.

**მიკრობთა ზრდის შესწავლა სხვადასხვა კონცენტრაციის შემცველ მარილიან საკვებ არეზე.** მიკრობთა ზრდას შევისწავლიდი სხვადასხვა კონცენტრაციის ნატრიუმის ქლორიდის შემცველ თხევად ნიადაგზე. ვიყენებდით სხვადასხვა კონცენტრაციის 0%, 1%, 2%, 4%, შემცველ მარილიან საკვებ არეს. საკვლევ იზოლატები შეგვქონდა ყველა სინჯარაში და ვათავსებდით 37°C -ზე 18-24სთ. ინკუბაციის შემდეგ ვნახულობით თითოეული შტამის ზრდას სხვადასხვა კონცენტრაციის სინჯარაში და ვიწერდით შედეგს.

## 2.5.2 ანტიბიოტიკომგრძობელობის განსაზღვრა კირბი-ბაუერის სტანდარტული დისკ-დიფუზიის მეთოდით

ანტიბიოტიკებისადმი მგრძობელობას ვსაზღვრავდით კირბი-ბაუერის დისკის დიფუზიის მეთოდით, რომელიც შედგება ეტაპებისგან : აგარის ფინჯანზე ვარჩევთ სულ მცირე 4 კარგად იზოლირებულ კოლონიას ერთნაირი მორფოლოგიით. თითოეული კოლონია სათესი მარყუჟის წვერით გადაგვაქვს 5 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარის შემცველ სინჯარაში. ბაქტერიული სუსპენზია სიმღვრივით უნდა შეესაბამებოდეს მაკფარლანდის 0.5 სტანდარტს. სტერილური, ბამბის თავიანი წკირი უნდა ჩავუშვათ აღნიშნულ სუსპენზიაში და კარგად დავასველოთ, ამის შემდგომ, ვთესავთ მშრალი Muller-Hinton-ს ფინჯნებს გაშტრიხვის მეთოდით. ვიმეორებთ ამ პროცედურას კიდევ ერთხელ და ფინჯანს ვატრიალებთ 60 °C, რადგან სუსპენზია თანაბრად განაწილდეს ფინჯნის ზედაპირზე. თანაბრად განაწილებთ ანტიბიოტიკებით გაჟღენთილ დისკებს აგარის ფინჯნის ზედაპირზე სტერილური პინცეტის მეშვეობით. მას შემდეგ რაც დისკი აგარს შეეხება, ცდომილების თავიდან ასაცილებლად, ფინჯანი აღარ უნდა ვამოძრაოთ, ვინაიდან აგართან შეხებისთანავე დისკის შემადგენლობაში არსებული კონცენტრატის ნაწილი მყისიერად დიფუზირდება აგარში და დისკის სხვა ადგილზე გადატანის შემთხვევაში ხდება კონცენტრატის ნაწილობრივი კარგვა. ფინჯნებს ვათავსებთ თერმოსტატში 37°C, აერობულ პირობებში 18-24სთ. ინკუბაციის შემდეგ ვათვალიერებთ თითოეულ

ფინჯანს და სახაზავის მეშვეობით ვზომავთ სრული ინჰიბიციის ზონის დიამეტრს დისკის დიამეტრის ჩათვლით. სახაზავით გაზომვისას ზონები იზომება უახლოეს მილიმეტრამდე. რის საფუძველზეც თითოეული ანტიბიოტიკის მიმართ ხდებოდა მგრძნობელობის ხარისხის დადგენა: მგრძნობიარე (S), საშუალოდ მგრძნობიარე (I), რეზისტენტული (R) სტანდარტული მონაცემებთან შედარებით (CLSI. 2023) [fda.gov/drugs/development-resources/antibacterial-susceptibility-test-interpretive-criteria](https://www.fda.gov/drugs/development-resources/antibacterial-susceptibility-test-interpretive-criteria)

## 2.6 ბაქტერიული ვირუსების გამრავლების და კონცენტრირების, ბაქტერიოფაგების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლის მეთოდები

**ფაგის ზუსტი ტიტრს ვადგენდით** ტესტ-შტამზე ორშრიანი აგარის მეთოდით.

**ფაგების სუფთა ხაზების მისაღებად** ვიყენებდით ორშრიანი აგარის მეთოდს, რისთვისაც თანმიმდევრული პასაჟებით ვახდენდით მორფოლოგიურად ერთგვაროვანი კოლონიებიდან 5-10 კოლონიის შერჩევას.

**ფაგის ნეგატიური კოლონიის ფორმას** ვადგენდით სტანდარტული ორშრიანი აგარის მეთოდით. ნეგატიური კოლონიებს ვაანალიზებდით მათი ფორმირების დამთავრების შემდეგ (18-24სთ).

**ფაგების ლიზისის სტაბილობას** ვსაზღვრავდით თხიერ არეში აპელმანის მეთოდის გამოყენებით. 4,5 მლ სოიოს ბულიონის შემცველ სინჯარებში ვამზადებდით საკვლევი ბაქტერიოფაგის 0,2 მკმ-იან მემბრანულ ფილტრში გატარებული სუსპენზიის განზავებებს ისე, რომ ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა პირველი სინჯარიდან ბოლო სინჯარისკენ შემცირებულიყო თანმიმდევრობით  $10^8$ ნაწ/მლ  $10^1$ ნაწ/მლ. თითოეულ სინჯარაში შეგვქონდა ექსპონენციალურ ფაზაში მყოფი ბაქტერიული კულტურის სუსპენზია საბოლოო კონცენტრაციით საშუალოდ  $1-2 \cdot 10^8$  უჯრ/მლ, შემდგომ ვახდენდით ინკუბაციას  $28^{\circ}\text{C}$ -ზე 2-4-6-8-24 საათის განმავლობაში. საკვლევი ფაგის ლიზისის სტაბილობის მახასიათებლად აღვრიცხავდით ინკუბაციის დროს და იმ ბოლო განზავებას, რომელ სინჯარაშიც არ შეინიშნებოდა ბაქტერიული კულტურის ზრდა.

**ფაგის ვირიონის მორფოლოგიას ვსწავლობდით ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით.** პრეპარატებს ვამზადებდით ნეგატიური კონსტრასტირების მეთოდით.



ფაგის ბაქტერიის სუსპენზია ან კონცენტრატი გადაგვექონდა საკონტრასტო ნიმუშებთან ერთად კოლოდიუმის აპკებზე – ბადეებზე. სტრუქტურულ კვლევას ვაწარმოებდით ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით. შვიდი მიკროლიტრი კონცენტრირებული ფაგის სუსპენზია გადაგვექონდა ნახშირბადით დაფარული სპილენძის ბადეებზე. ფაგების ვიზუალიზაცია მოხდა Jeol 1010 ელექტრონული მიკროსკოპით (JEOL Inc. Peabody, MA, აშშ).

**ბაქტერიოფაგების კონცენტრატს მყარ არეზე** ვიღებდით სტანდარტული მეთოდით, რაც გულისხმობს თხელი აგარის ფენაში მაღალი სიმკვრივის ბაქტერიული სუსპენზიის ფაგოლიზის და მინიმალური მოცულობის თხევად არეში ფაგის შემდგომ ექსტრაგირებას. ფაგურ კონცენტრატს ვამზადებდით საშუალოდ 10 ფინჯანზე: 0,5% აგარიან საკვებ ნიადაგში შეგვექონდა ბაქტერიები  $1-5 \times 10^8$  უჯ/მლ და ბაქტერიოფაგები  $1 \times 10^5$  ნაწ/მლ საბოლოო კონცენტრაციით. ინკუბაციას ვახდენდით  $28^{\circ}\text{C}$ -ზე 18-24 სთ, ვასხავდით ბულიონს და ვხსნიდით აგარის ზედა ფენას შპადელით, ვაცენტრიფუგირებდით 6000 ბრ/წთ 30 წთ და ვამოწმებდით ტიტრს გრაციას მეთოდით.

კონცენტრირებისა და ბაქტერიოფაგის შემდგომი გაწმენდის მიზნით ვახდენდით დიფერენციალურ ცენტრიფუგირებას 18000 ბრ/წთ  $+4^{\circ}\text{C}$ -ზე, 1,5 სთ-ის განმავლობაში. პრეპარატის საწყისი მოცულობიდან გამომდინარე ნალექს ვხსნიდით საშუალოდ 20-ჯერ ნაკლები მოცულობის ბუფერულ ხსნარში PBS (pH 7,2), ვდგამდით მაგნიტურ სარეველაზე  $+4^{\circ}\text{C}$ -ზე 3-4 სთ-ის განმავლობაში და შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 3500-4000 ბრ/წთ 20 წუთს, ბაქტერიული ნარჩენების მოცილების მიზნით. ფაგური პრეპარატის ტიტრს ვსაზღვრავდით ორშრიანი მეთოდით.

**ფაგომგრძობელობის განსაზღვრა (ლიზისური სპექტრი) ორშრიანი აგარის მეთოდით**

ბაქტერიოფაგების ლიზისური სპექტრის განსაზღვრა: ფაგების ლიზისური სპექტრს ვსწავლობდით მყარ საკვებ არეზე. „სპოტ ტესტის“ მეშვეობით ფაგის სუსპენზიის წვეთები გადაგვექონდა ლოგარითმულ ფაზაში არსებული ბაქტერიების გაზონებზე. საცდელი ფაგის სამუშაო ტიტრი შეადგენდა:  $1 \times 10^8$  ნაწ/მლ. შედეგს აღვრიცხავდით 18-24 საათის ინკუბაციის შემდგომ. შედეგები ჩაიწერა აღნიშნული მეთოდის კლასიკური შეფასების შესაბამისად:

Cl - სრული ლიზისი, მიკრობზე ფაგის მოქმედების ადგილი გამჭვირვალეა;

OL - აღინიშნება ლიზისური უბნები ბუნდოვანია;

SCL- ძლიერი მეორადი ზრდა ლიზისურ უბნებზე;

tv-ერთეული კოლონიები;

“-“ - არანაირი კვალი.

**ბაქტერიოფაგების თერმოსტაბილობის შესწავლა.** საკვლევ ფაგებს ვანზავებით  $10^6$  ნაწ/მლ შემცველობამდე და ვათავსებდით წყლის აბაზანაში სხვადასხვა ტემპრატურაზე ( $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $70^{\circ}$ ) სულ 60 წუთით. კონტროლად ვიღებდით ფაგების იგივე ( $10^6$  ნაწ/მლ) კონცენტრაციას, რომელსაც ვათავსებდით ოთახზე  $25^{\circ}\text{C}$ -ზე. საკვლევი და საკონტროლო სინჯარებიდან გადმოგვქონდა ფაგის 0,1 მლ და ვტიტრავდით გრაციის მეთოდით. საკვლევი და საკონტროლო სინჯარებიდან ნიმუშებს ვიღებდით აბაზანაში სინჯარების მოთავსებიდან 15 წუთში, 30 წუთში და 60 წუთში.

**მგრძნობელობა pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობების მიმართ.** ფაგზე გარემო არის Ph-ის გავლენას ვსწავლობდით შემდეგნაირად:  $1 \times 10^8$  ნაწ/მლ ტიტრის მქონე ფაგის სუსპენზია შეგვქონდა ტრის-აცეტატურ ბუფერში (pH2,pH4,pH7,pH9)ვახდენდით ინკუბაციას სრულად 2 საათი. ნიმუშებში ვსაზღვრავდით სიცოცხლისუნარიანი ნაწილაკების რაოდენობას 30 წუთის, 60 წუთის და 120 წუთის შემდეგ.

**ფაგური დნმ-ის გამოყოფა (ექსტრაქცია)**

ფაგური დნმ გამოვყავით QIAamp® DNA Mini Kit (50)-ის საშუალებით: 20 მკლ პროტეინაზა K შევიტანეთ 1.5მლ მიკროცენტრიფუგის სინჯარაში და დავუმატეთ 200მკლ ფაგი და 180მკლ ATL ბუფერი, დავავორტექსირეთ და დავაყვინეთ 10 წუთი  $56^{\circ}\text{C}$ -ზე. 10 წუთის შემდეგ დავამატეთ 200მკლ AL ბუფერი და 200 მკლ 96-100% ეთანოლი, ისევ დავავორტექსირეთ და დავიწყეთ რეცხვის პროცესი ცენტრიფუგირების საშუალებით.

**ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი და გელ-ელექტროფორეზი** გამოყოფილ ფაგურ დნმ-ს ვამუშავებდით სხვადასხვა რესტრიქციული ენზიმებით (SalI, EcoRI, EcoRV, HindIII, BglI, XhoI, XbaI )მწარმოებლის მიერ მოწოდებულ პირობებში. ვამზადებდით აგაროზას 1% გელს, სადაც ინკუბაციის შემდეგ შეგვქონდა ნიმუშები, კერძოდ, პირველად შეგვაქვს დნმ-ის მარკერი და შემდგომ ნიმუშები, რომელიც შერეულია საღებავთან (ბრომფენოლის ლურჯთან). საღებავი საჭიროა

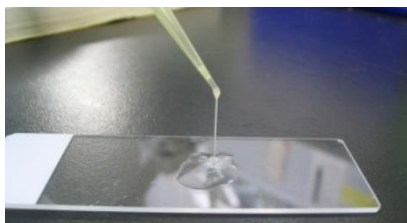
ვიზუალიზაციისათვის და ასევე დნმ-ის უკეთ დასალექად. მარკერად ვიყენებით  $\lambda$  ფაგის დნმ-ს დაჭრილს HindIII ფერმენტით (Sigma). ელექტროფორეზს ვუშვებდით 70წთ-ის განმავლობაში. ელექტროფორეზის დასრულების შემდეგ გელს ვლავდით ეთიდიუმ ბრომიდით (0,5mg/ml) 15-20 წუთის განმავლობაში. ვათავსებდით დისტილირებულ წყლიან აბაზანაში 10-15 წუთი და შედეგს ვნახულობდით UV-ილუმინატორზე. ფოტო მასალის მისაღებად ვიყენებდით Gel-Logic 100 (Kodak) სისტემის ფოტოკამერას და Molecular Imaging Software V.4.0.3. (Kodak) კომპიუტერულ პროგრამას.

### 3 კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

#### 3.1 *R. solanacearum*-ის შტამების ფენოტიპური დახასიათება

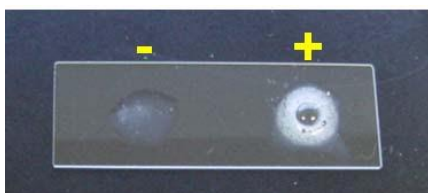
*R. solanacearum*-ის შტამების ფენოტიპური დახასიათებისთვის შევისწავლეთ მათი ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური მახასიათებლები.

**KOH-ის ტესტმა** გამოავლინა, რომ საკვლევი შტამები ხასიათდებოდა წელვადობით, რაც დამახასიათებელია გრამ - ბაქტერიებისათვის. (ცხრილი1; სურათი 1.).



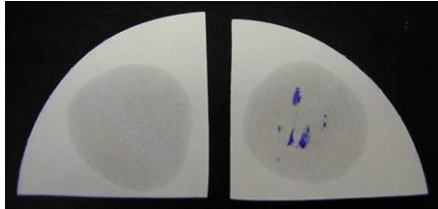
სურათი 1. KOH-ის ტესტი

**კატალაზა ტესტმა** გამოავლინა, რომ ლაბორატორიაში არსებული საკვლევი შტამები იყო კატალაზა დადებითი. 3% წყალბადის ზეჟანგის ( $H_2O_2$ ) მოქმედებისას წარმოიქმნა ბუშტები. (ცხრილი 1 ; სურათი 2)



სურათი 2. კატალაზა ტესტი

ოქსიდაზა ტესტმა გვიჩვენა რომ ჩვენი საკვლევი შტამები ხასიათდებოდა დადებითი რეაქციით. ეს ტესტი დაგვეხმარა კიდევ ერთხელ დავრწმუნებულიყავით რომ საკვლევი შტამები მიეკუთვნებოდა *R. solanacearum*-ის სახეობას და განვასხვაოთ ფსევდომონადების ოჯახის სხვა წარმომადგენლებისგან. (ცხრილი 1; სურათი 3).



სურათი 3. ოქსიდაზა ტესტი

D-გლუკოზის ფერმენტაცია/ოქსიდაცია ყველა საკვლევი შტამი ახდენდა გლუკოზის ფერმენტაციას მხოლოდ აერობულ პირობებში (უზეთო სინჯარაში) (ცხრილი 1; სურათი 4).



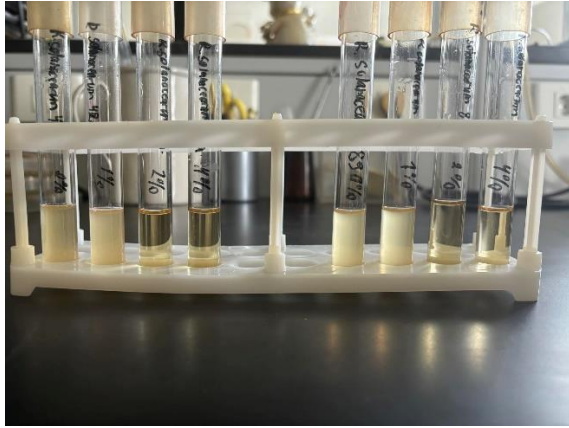
სურათი 4. *R. solanacearum*-ის შტამების D-გლუკოზის ფერმენტაცია/ოქსიდაციის ტესტი.

ტოლერანტობა NaCl-ის მიმართ *R. solanacearum*-ის ზრდა ნატრიუმის ქლორიდის (NaCl) სხვადასხვა კონცენტრაციებში შეფასებული იყო მარილის ტოლერანტობის დასადგენად. NaCl-ის არარსებობა (0%) : ბაქტერიები კარგად იზრდებოდნენ ისეთ გარემოში, სადაც არ იყო დამატებული ნატრიუმის ქლორიდი.

დაბალი NaCl (1%) : ბაქტერიულმა შტამებმა ასევე, მოახერხეს 1% ნატრიუმის ქლორიდის შემცველ საკვებ არეში გაზრდა.

ზომიერი NaCl (2%) : საკვებ არეში 2% ნატრიუმის ქლორიდით, ბაქტერიების უმეტესობა ვერ იზრდებოდა.

მაღალი NaCl (4%) : არ დაფიქსირებულა ბაქტერიების ზრდა 4% ნატრიუმის ქლორიდის შემცველ საკვებ არეში. ეს მეტყველებს იმაზე, რომ *Ralstonia solanacearum* არ შეუძლია გადარჩეს ან გამრავლდეს მაღალი მარილიან გარემოში .( ცხრილი 1; სურათი 5)



სურათი 5. *R. solanacearum*-ის ორი შტამის ტოლერანტობა NaCl-ის მიმართ

ცხრილი 1 *R. solanacearum*-ის ბიოქიმიური თვისებების დახასიათება

№	<i>Ralstonia solanacearum</i> იზოლატები	ოქსიდაზა	კატალაზა	KOH	ოქსიდაცია	ფერმენტაცია	0%-იან NaCl	1%-იან NaCl	2%-იან NaCl	4%-იან NaCl
1.	<i>R. solanacearum</i> 89	+	+	+	+	-	+	+	-	-
2.	<i>R. solanacearum</i> 2	+	+	+	+	-	+	+	-	-
3.	<i>R. solanacearum</i> J7	+	+	+	+	-	+	+	-	-
4.	<i>R. solanacearum</i> 19	+	+	+	+	-	+	+	-	-
5.	<i>R. solanacearum</i> 58A	+	+	+	+	-	+	+	-	-
6.	<i>R. solanacearum</i> 2A	+	+	+	+	-	+	+	-	-
7.	<i>R. solanacearum</i> 100	+	+	+	+	-	+	+	-	-
8.	<i>R. solanacearum</i> 42A	+	+	+	+	-	+	+	-	-
9.	<i>R. solanacearum</i> 80	+	+	+	+	-	+	+	-	-
10.	<i>R. solanacearum</i> 383	+	+	+	+	-	+	+	-	-
11.	<i>R. solanacearum</i> 86	+	+	+	+	-	+	+	-	-
12.	<i>R. solanacearum</i> 92	+	+	+	+	-	+	+	-	-
13.	<i>R. solanacearum</i> 94	+	+	+	+	-	+	+	-	-
14.	<i>R. solanacearum</i> 91	+	+	+	+	-	+	+	-	-
15.	<i>R. solanacearum</i> 57	+	+	+	+	-	+	+	-	-
16.	<i>R. solanacearum</i> 61	+	+	+	+	-	+	+	+	-

17.	<i>R.solanacerum</i> 88	+	+	+	+	-	+	+	-	-
18.	<i>R.solanacerum</i> 43	+	+	+	+	-	+	+	-	-
19.	<i>R.solanacerum</i> 5	+	+	+	+	-	+	+	-	-
20.	<i>R.solanacerum</i> 3725	+	+	+	+	-	+	+	-	-
21.	<i>R.solanacerum</i> 4211	+	+	+	+	-	+	+	-	-
22.	<i>R.solanacerum</i> 63	+	+	+	+	-	+	+	+	-
23.	<i>R.solanacerum</i> 48	+	+	+	+	-	+	+	-	-
24.	<i>R.solanacerum</i> 4214	+	+	+	+	-	+	+	-	-
25.	<i>R.solanacerum</i> 93	+	+	+	+	-	+	+	-	-
26.	<i>R.solanacerum</i> J3	+	+	+	+	-	+	+	-	-
27.	<i>R.solanacerum</i> 65	+	+	+	+	-	+	+	-	-
28.	<i>R.solanacerum</i> 325	+	+	+	+	-	+	+	-	-
29.	<i>R.solanacerum</i> 55	+	+	+	+	-	+	+	-	-
30.	<i>R.solanacerum</i> 42	+	+	+	+	-	+	+	-	-
31.	<i>R.solanacerum</i> 9	+	+	+	+	-	+	+	-	-
32.	<i>R.solanacerum</i> 46	+	+	+	+	-	+	+	-	-
33.	<i>R.solanacerum</i> 47	+	+	+	+	-	+	+	-	-
34.	<i>R.solanacerum</i> 67	+	+	+	+	-	+	+	-	-
35.	<i>R.solanacerum</i> 99	+	+	+	+	-	+	+	+	-
36.	<i>R.solanacerum</i> J5	+	+	+	+	-	+	+	-	-
37.	<i>R.solanacerum</i> 18	+	+	+	+	-	+	+	-	-
38.	<i>R.solanacerum</i> 97	+	+	+	+	-	+	+	-	-
39.	<i>R.solanacerum</i> 62	+	+	+	+	-	+	+	-	-
40.	<i>R.solanacerum</i> J2	+	+	+	+	-	+	+	-	-

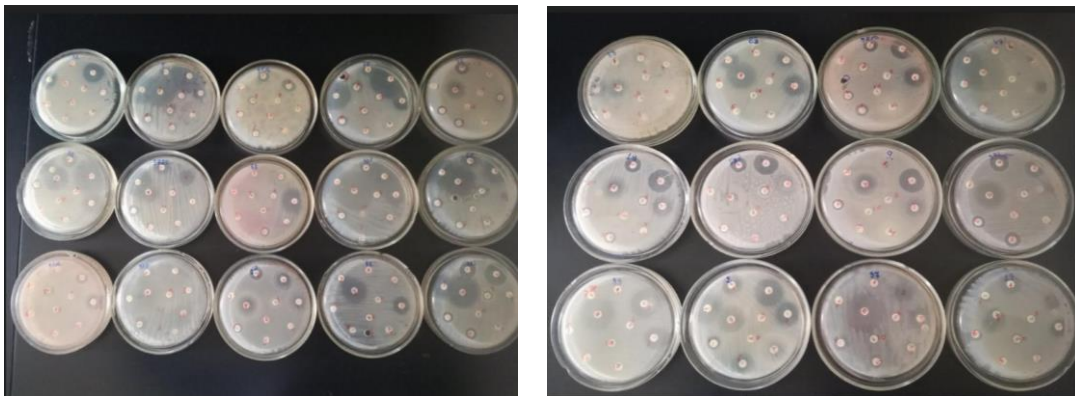
ამრიგად, *R. solanacearum*-ის კულტურალურ-მორფოლოგიური და ბიოქიმიური პროფილის შესწავლისას გამოვლინდა, რომ ჩვენი საკვლევი 40 იზოლატი ბიოქიმიური მახასიათებლებით მსგავსი იყო *R. solanacearum*-ის ტიპური შტამის. კერძოდ, ყველა ქართული იზოლატი იყო გრამ უარყოფითი, ოქსიდაზა და კატალაზა დადებითი, ახასიათებთ გლუკოზის ფერმენტაცია აერობულ პირობებში და კარგად იზრდებიან 0%, 1%- იანი NaCl-ის შემცველ არეში, 2% -იანი NaCl-ის შემცველ არეში ძირითადად ითრგუნებოდა ამ შტამების ზრდა და არცერთი შტამი არ გაიზარდა 4%-იანი NaCl-ის შემცველ არეში.

### 3.2 *R. solanacearum*-ის შტამების ანტიბიოტიკომგრძობელობის შესწავლა

ამისთვის გამოვიყენეთ კირი-ბაუერის სტანდარტული დისკ-დიფუზიის მეთოდი. შტამები შემოწმდა შენდეგ 10 ანტიბიოტიკზე : კანამიცინი 30  $\mu$ გ, ციპროფლოქსაცინი 5  $\mu$ გ, ქლორანფენიკოლი 30  $\mu$ გ, ამპიცილინი 10  $\mu$ გ, სტრეპტომიცინი 10  $\mu$ გ, გენტამიცინი 10  $\mu$ გ, ტეტრაციკლინი 30  $\mu$ გ, სულფამეთოქსაზოლი 100  $\mu$ გ, პოლიმიქსინ-B300IU, ცეფაზოლინი 30  $\mu$ გ. (სურათი 6)

მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ შესწავლილი შტამების 25 %, რეზისტენტულია ყველა ანტიბიოტიკის მიმართ. ყველაზე მაღალი მგრძობელობა 42.5% დაფიქსირდა ციპროფლოქსაცინის მიმართ.(ცხრილი 2.) *R. solanacearum*-ის შტამები ხასიათდებიან ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის სხვადასხვა დონით. საკვლევი შტამები მაღალი რეზისტენტობით ხასიათდებიან ექვსი ანტიბიოტიკის მიმართ კერძოდ ცეფაზოლინი 100%, ამპიცილინი 97.5 %, პოლიმიქსინ 97.5 %, გენტამიცინი 95 %, კანამიცინი 92.5%, სტრეპტომიცინი 92.5%, და შედარებით დაბალ რეზისტენტობას ავლენენ დანარჩენ 4 ანტიბიოტიკზე თუმცა რეზისტენტული იზლატების პროცენტი ამ შუალედში არის წარმოდგენილი.(იხ.დიაგრამა 1)

**სურათი 6.** *R. solanacearum*-ის შტამების ანტიბიოტიკომგრძობელობის განსაზღვრა კირი-ბაუერის სტანდარტული დისკ-დიფუზიის მეთოდით.



ცხრილი 2. *R. solanacearum*-ის 40 შტამის ანტიბიოტიკებისადმი მგრძობელობის

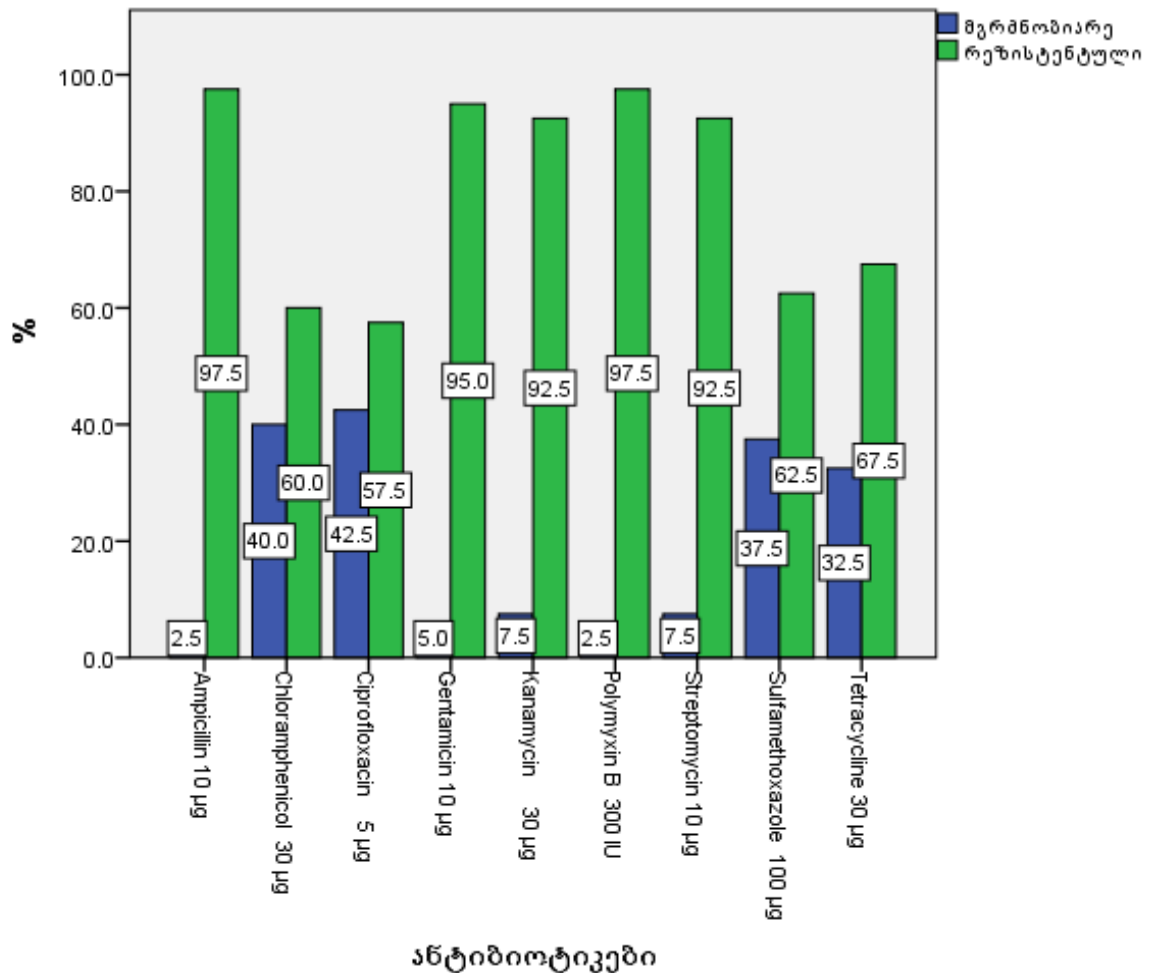
შესწავლა

№	Ralstonia solanacearum იზოლატები	ანტიბიოტიკები									
		Kanamycin 30 µg	Ciprofloxacin 5 µg	Chloramphenicol 30 µg	Ampicillin 10 µg	Streptomycin 10 µg	Gentamicin 10 µg	Tetracycline 30 µg	Sulfamethoxazole 100 µg	Polymyxin B 300 IU	Cefazolin 30 µg
1	<i>R. solanacearum</i> 89	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R
2	<i>R. solanacearum</i> 2	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R
3	<i>R. solanacearum</i> J7	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R
4	<i>R. solanacearum</i> 19	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R
5	<i>R. solanacearum</i> 58A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
6	<i>R. solanacearum</i> 2A	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R
7	<i>R. solanacearum</i> 92	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R
8	<i>R. solanacearum</i> 91	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R
9	<i>R. solanacearum</i> 88	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R
10	<i>R. solanacearum</i> 43	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R
11	<i>R. solanacearum</i> 5	R	S	I	R	R	R	S	S	R	R
12	<i>R. solanacearum</i> 3725	R	I	R	R	R	I	S	R	R	R
13	<i>R. solanacearum</i> 4211	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
14	<i>R. solanacearum</i> 63	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
15	<i>R. solanacearum</i> 48	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
16	<i>R. solanacearum</i> 93	I	S	S	R	R	R	I	S	R	R
17	<i>R. solanacearum</i> J3	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R
18	<i>R. solanacearum</i> 65	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R
19	<i>R. solanacearum</i> 325	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R
20	<i>R. solanacearum</i> 55	R	S	S	R	R	I	S	R	R	R
21	<i>R. solanacearum</i> 9	R	S	I	R	R	R	R	I	R	R
22	<i>R. solanacearum</i> 46	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R
23	<i>R. solanacearum</i> 47	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
24	<i>R. solanacearum</i> 99	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R
25	<i>R. solanacearum</i> J5	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R
26	<i>R. solanacearum</i> 18	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
27	<i>R. solanacearum</i> 97	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R
28	<i>R. solanacearum</i> 62	R	R	S	R	R	R	I	S	R	R
29	<i>R. solanacearum</i> J2	R	I	S	R	I	R	R	R	R	R
30	<i>R. solanacearum</i> 100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
31	<i>R. solanacearum</i> 42A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
32	<i>R. solanacearum</i> 80	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
33	<i>R. solanacearum</i> 383	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
34	<i>R. solanacearum</i> 86	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
35	<i>R. solanacearum</i> 94	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
36	<i>R. solanacearum</i> 57	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
37	<i>R. solanacearum</i> 61	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
38	<i>R. solanacearum</i> 4214	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
39	<i>R. solanacearum</i> 42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
40	<i>R. solanacearum</i> 67	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S- მგრძობიარე შტამები; I - შუალედური შტამები; R- რეზისტენტული შტამები.



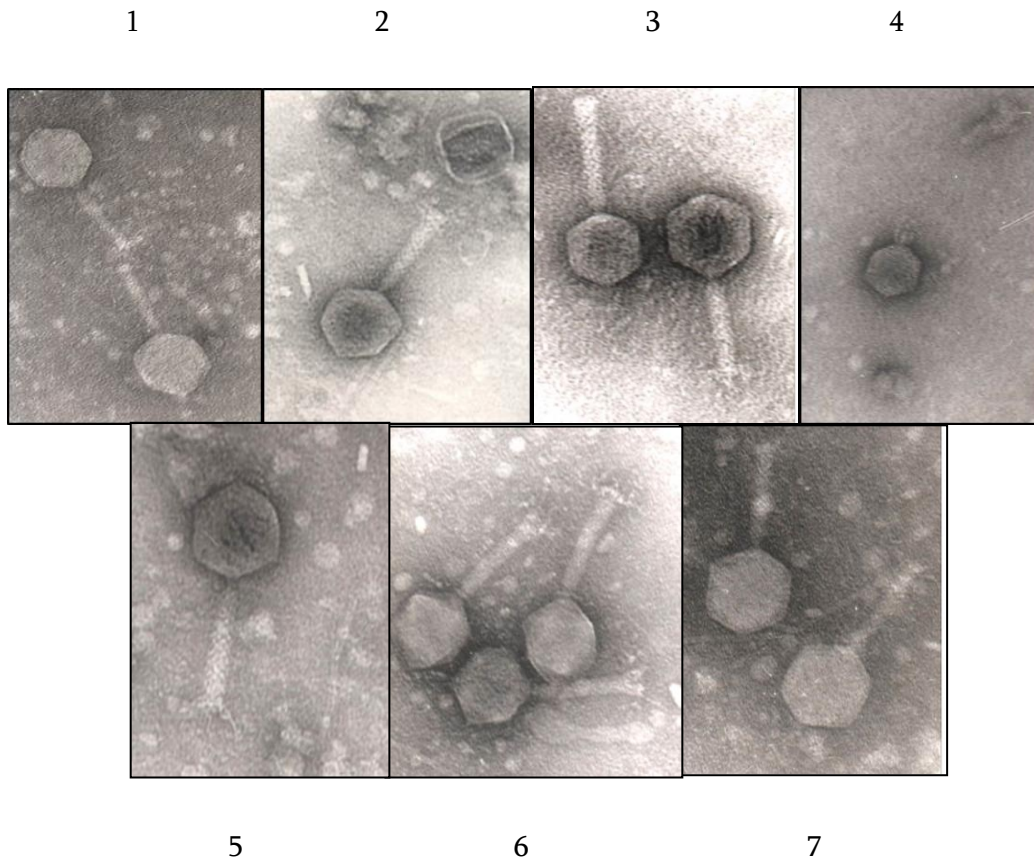
დიაგრამა 1. ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტული და მგრძობიარე *R. solanacearum*-ის იზოლატების პროცენტული მაჩვენებელი



### 3.3 ფაგის მორფოლოგიის შესწავლა ელექტრონული მიკროსკოპით

მიკრობთა ეკოლოგიის ლაბორატორიის კოლექციაში არსებულ სპეციფიკურ 7 ფაგის მორფოლოგია შევისწავლეთ Jeol 1010 ელექტრონული მიკროსკოპით, კვლევებმა გამოავლინა ძირითადად Myoviridae ტიპის მორფოლოგიის მქონე *R. solanacearum*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგები. თუმცა ასევე გვხვდება Podoviridae მორფოლოგიის ფაგებიც.

## სურათი 7. ბაქტერიოფაგის ვირიონის მორფოლოგია



1- R.s 2-2; 2- R.s 3-1; 3- R.s 6-3; 4 - R.s 4; 5- R.s 5; 6- R.s 6; 7- R.s 455

### 3.4 *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ლიზისური სპექტრის განსაზღვრა

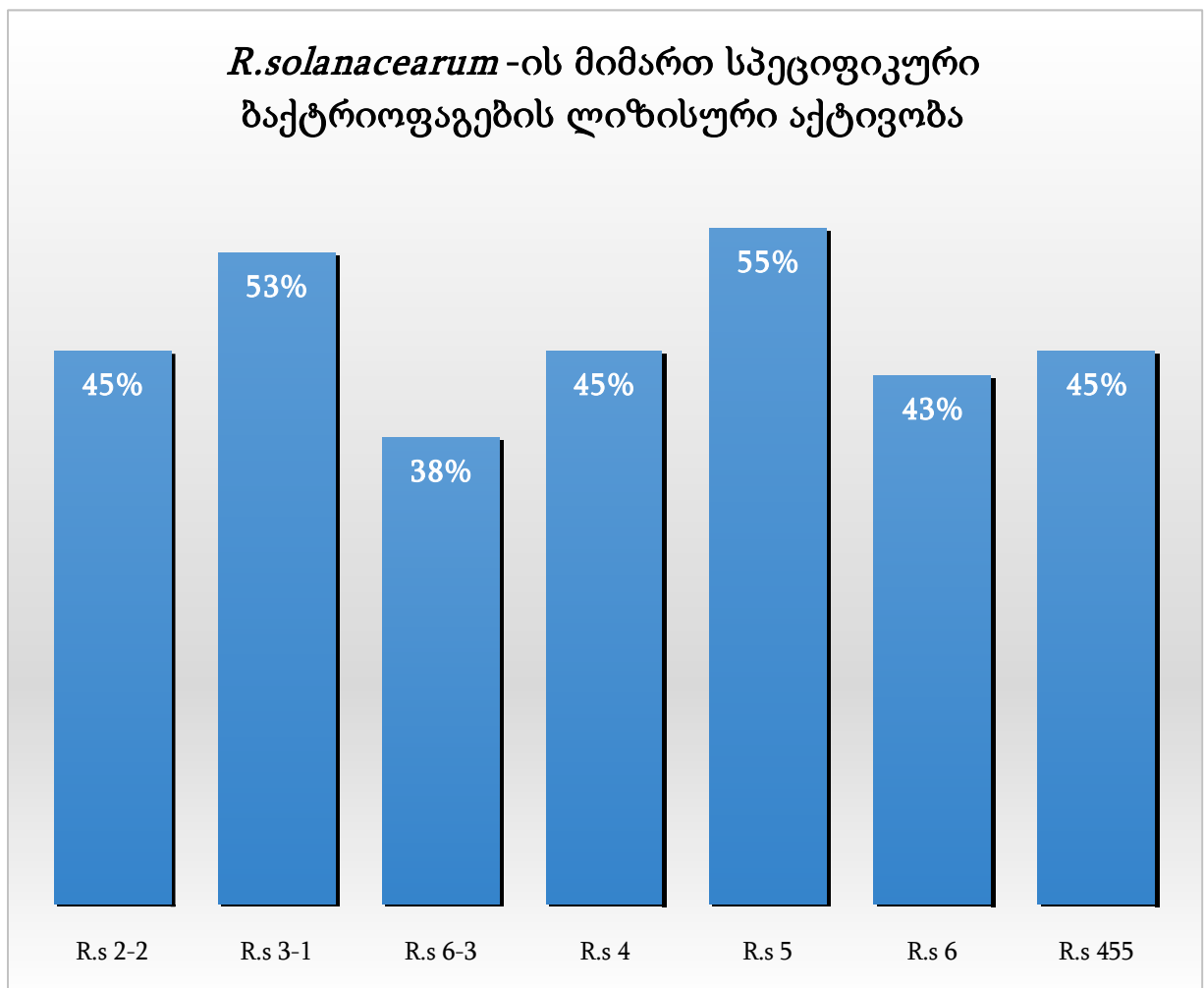
*R. solanacearum*-ის 40 შტამის მგრძნობელობა შევისწავლეთ *R. Solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური 7 ფაგის მიმართ. კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა ხასიათდება ლიზისური აქტივობით. შტამების 23% არ იყო მგრძნობიარე მოცემული ფაგების მიმართ. ჩატარებულმა სკრინინგმა გვიჩვენა, რომ საცდელი შტამები 78% ლიზირდება ბაქტერიოფაგების ერთობლიობით (7 ბაქტერიოფაგი). ბაქტერიოფაგებისადმი მაღალი მგრძნობელობით გამოირჩეოდა რამდენიმე შტამი: *R. Solanacearum* 2, *R. Solanacearum* 19, *R. Solanacearum* 2A, *R. Solanacearum* 57, *R. Solanacearum* 5, *R. Solanacearum* 63, *R. Solanacearum* J3, *R. Solanacearum* 62. ფაგებისადმი მგრძნობელობა არ გამოავლინა *R. solanacearum* -ის 9 შტამმა, და მათ მიმართ აქტიური ფაგების ძიება გაგრძელდება. რაც შეეხება *R. solanacearum* -ის ცალკეული ფაგების

მოქმედების სპექტრს, ის მერყეობს 38%-დან-55%-მდე (იხ. დიაგრამა 2), ანუ აქვთ საშუალო ლიზისური სპექტრი, თუმცა ისიც უნდა აღინიშნოს, რომ ფაგების ლიზისური სპექტრი ურიერთგადამფარავია, რაც სხვადასხვა შტამების მიმართ აქტიური ფაგური პრეპარატის შექმნის შესაძლებლობას იძლევა.

**ცხრილი 3. *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების ლიზისური სპექტრი**

№	<i>Ralstonia solanacearum</i> შტამები	ბაქტერიოფაგები							მოქმედი ფაგების რაოდენობა თითოეულ შტამზე
		R.s 2-2	R.s 3-1	R.s 6-3	R.s 4	R.s 5	R.s 6	R.s 455	
1	<i>R.solanacearum</i> 89	-	scl	-	-	scl	-	-	2
2	<i>R.solanacearum</i> 2	cl	scl	cl	scl	scl	scl	scl	7
3	<i>R.solanacearum</i> J7	scl	-	-	-	-	-	Scl	2
4	<i>R.solanacearum</i> 19	ol	ol	scl	ol	ol	ol	ol	7
5	<i>R.solanacearum</i> 58A	cl	cl	-	cl	cl	cl	cl	6
6	<i>R.solanacearum</i> 2A	cl	cl	tv	cl	cl	cl	cl	7
7	<i>R.solanacearum</i> 42A	-	scl	scl	-	-	-	-	2
8	<i>R.solanacearum</i> 80	-	cl	-	-	scl	-	-	2
9	<i>R.solanacearum</i> 86	-	-	ol	-	ol	-	-	2
10	<i>R.solanacearum</i> 94	cl	scl	scl	-	scl	-	-	4
11	<i>R.solanacearum</i> 57	cl	cl	tv	cl	cl	cl	cl	7
12	<i>R.solanacearum</i> 61	-	ol	ol	-	-	-	-	2
13	<i>R.solanacearum</i> 88	-	-	-	cl	-	cl	cl	3
14	<i>R.solanacearum</i> 43	scl	scl	-	-	scl	-	-	3
15	<i>R.solanacearum</i> 5	scl	scl	scl	scl	scl	scl	scl	7
16	<i>R.solanacearum</i> 3725	-	-	ol	-	ol	-	-	2
17	<i>R.solanacearum</i> 4211	ol	ol	ol	tv	-	ol	-	5
18	<i>R.solanacearum</i> 63	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	7
19	<i>R.solanacearum</i> 48	cl	cl	-	cl	cl	cl	cl	6
20	<i>R.solanacearum</i> 93	scl	scl	-	-	cl	-	-	3
21	<i>R.solanacearum</i> J3	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	7
22	<i>R.solanacearum</i> 65	-	-	-	-	cl	cl	cl	3
23	<i>R.solanacearum</i> 325	-	-	-	ol	-	-	-	1
24	<i>R.solanacearum</i> 55	-	-	-	cl	-	cl	cl	3
25	<i>R.solanacearum</i> 9	-	-	-	cl	-	cl	cl	3
26	<i>R.solanacearum</i> 67	cl	cl	-	cl	cl	cl	cl	6
27	<i>R.solanacearum</i> J5	scl	scl	cl	-	cl	-	tv	5
28	<i>R.solanacearum</i> 18	-	-	-	-	scl	-	-	1
29	<i>R.solanacearum</i> 97	-	-	-	ol	-	-	-	1
30	<i>R.solanacearum</i> 62	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	7
31	<i>R.solanacearum</i> J2	ol	ol	-	ol	ol	ol	ol	6
32	<i>R.solanacearum</i> 100	-	-	-	-	-	-	-	0
33	<i>R.solanacearum</i> 383	-	-	-	-	-	-	-	0
34	<i>R.solanacearum</i> 92	-	-	-	-	-	-	-	0
35	<i>R.solanacearum</i> 91	-	-	-	-	-	-	-	0
36	<i>R.solanacearum</i> 42	-	-	-	-	-	-	-	0
37	<i>R.solanacearum</i> 4214	-	-	-	-	-	-	-	0
38	<i>R.solanacearum</i> 46	-	-	-	-	-	-	-	0
39	<i>R.solanacearum</i> 47	-	-	-	-	-	-	-	0
40	<i>R.solanacearum</i> 99	-	-	-	-	-	-	-	0
ფაგების მიმართ მგრძობიარე შტამების რაოდენობა		18	21	15	18	22	17	18	
ფაგების ლიზისური სპექტრი %		45%	53%	38%	45%	55%	43%	45%	

დიაგრამა 2. *R.solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობის შეფასება



### 3.5 *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი

საკვლევი 7 ფაგიდან გამოყოფილი დნმ დავჭერით 7 სხვადასხვა რესტრიქციული ენდონუკლეაზით და შევისწავლე *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების რესტრიქციული პროფილი. შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ხუთმა ფერმენტმა (SalI, EcorI, EcorV, Hind III, BglI) დაჭრა განსხვავებული რაოდენობის ფაგები. რესტრიქციული პროფილის შედარება საშუალებას გვაძლევს ვიმსჯელოთ საკვლევი ფაგების გენეტიკურ მრავალფეროვნებაზე. კერძოდ გამოიყო ხუთი სხვადასხვა ტიპის ფაგი.

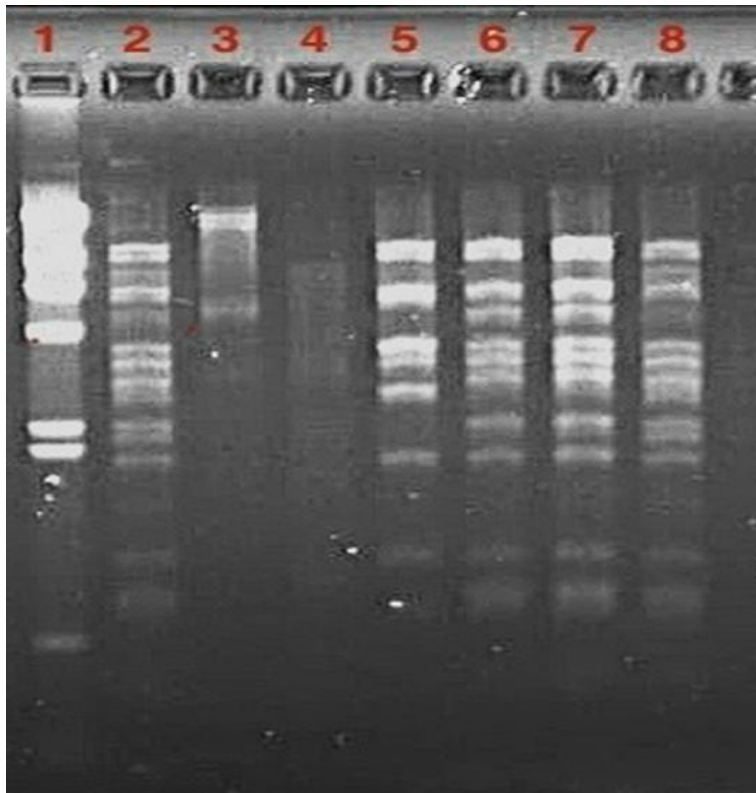
**ცხრილი 4.** ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი

რესტრიქციული ენდონუკლეაზები	R.s 2-2	R.s 3-1	R.s 6-3	R.s 4	R.s 5	R.s 6	R.s 455
Sall	+	-	-	+	+	+	+
EcoRI	+	+	-	-	+	+	+
EcoRV	+	-	-	+	+	+	+
HindIII	-	+	+	+	+	+	+
BglII	+	+	-	+	+	+	+
XhoI	-	-	-	-	-	-	-
XbaI	-	-	-	-	-	-	-

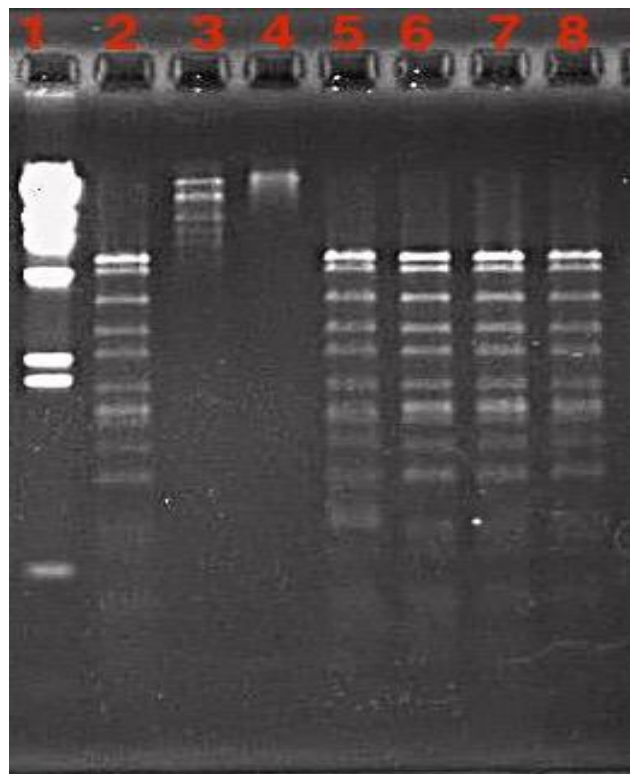


**სურათი 8.** 1.  $\lambda$  + HindIII ; 2. R.s 2-2 + Sall; 3. R.s 3-1+ Sall ; 4. R.s 6-3 + Sall ; 5. R.s 4 + Sall ;  
6. R.s 5 + Sall; 7. R.s 6 + Sall; 8. R.s 455 + Sall; 9.----- ; 10.R.s 2-2 + EcoRI ; 11. R.s 3-1+

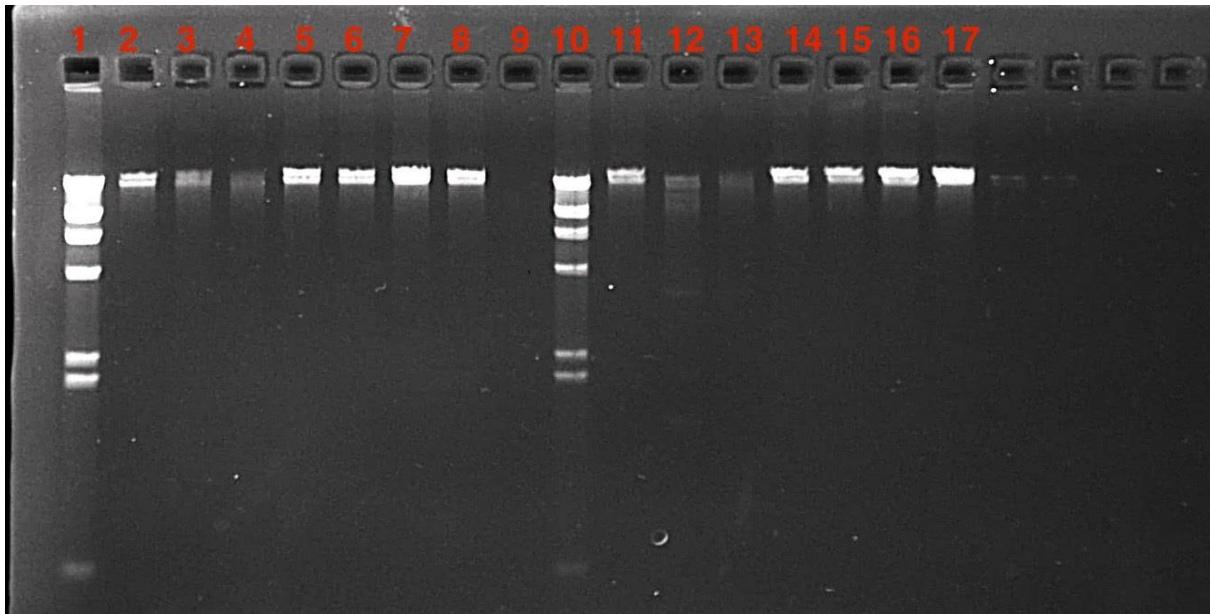
EcoRI ; 12. R.s 6-3 + EcoRI; 13.R.s 4 + EcoRI ; 14.R.s 5 + EcoRI ; 15. R.s 6 + EcoRI; 16. R.s 455 + EcoRI.



სურათი 9. 1.  $\lambda$  + HindIII ; 2.R.s 2-2 + EcoRV ; 3. R.s 3-1+ EcoRV 4. R.s 6-3 + EcoRV;  
5. R.s 4 + EcoRV; 6. R.s 5 + EcoRV; 7. R.s 6 + EcoRV; 8. R.s 455 + EcoRV.



სურათი 10. 1.  $\lambda$  + HindIII ; 2.R.s 2-2 + BglI; 3. R.s 3-1+ BglI; 4. R.s 6-3 + BglI; 5. R.s 4 + BglI; 6. R.s 5 + BglI; 7. R.s 6 + BglI; 8.R.s 455 + BglI.



სურათი 11. 1.  $\lambda$  + HindIII ; 2. R.s 2-2 + XhoI; 3. R.s 3-1+ XhoI; 4. R.s 6-3 + XhoI; 5. R.s 4 + XhoI; 6. R.s 5 + XhoI; 7. R.s 6 + XhoI ;8. R.s 455 + XhoI; 9. -----; 10.  $\lambda$  + HindIII ; 11. R.s 2-2 + XbaI; 12. R.s 3-1+ XbaI ; 13. R.s 6-3 + XbaI; 14. R.s 4 + XbaI; 15. R.s 5 + XbaI; 16. R.s 6 + XbaI; 17. R.s 455 + XbaI.

### 3.6 *R. solanacearum*-ის მიმართ შერჩეული სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ლიზისური სტაბილობა თხიერ საკვებ არეში

შევისწავლეთ საკვლევი ფაგების ლიზისური სტაბილობა თხიერ საკვებ არეში. ექსპერიმენტის შედეგად დადგინდა, რომ შერჩეული სამივე ფაგი(R.s 3-1; R.s 6-3; R.s 4) სტაბილურ ლიზისს ავლენდა 8 საათის განმავლობაში ყველა განზავებაში. 24 საათის შემდეგ ბაქტერიული ზრდა არ აღინიშნა სამივე (R.s 3-1, R.s 6-3, R.s 4) ფაგის შემთვევაში  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  განზავებაში, რაც შეეხება ბაქტერიული ზრდა  $10^{-4}$  განზავებიდან დაიწყო R.s 6-3 ფაგის შემთხვევაში და  $10^{-5}$  განზავებაში გვაქვს სიმღვრივე R.s 4 და R.s 3-1 ფაგთან.

ცხრილი 5. ლიზისური სტაბილობა თხიერ საკვებ არეში.

ფაგი	დრო	განზავება							
		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
R.s 3-1	2სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	4სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	6სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	8სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	24სთ	-	-	-	-	ბზ	ბზ	ბზ	ბზ
R.s 6-3	2სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	4სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	6სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	8სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	24სთ	-	-	-	ბზ	ბზ	ბზ	ბზ	ბზ
R.s 4	2სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	4სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	6სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	8სთ	-	-	-	-	-	-	-	-
	24სთ	-	-	-	-	ბზ	ბზ	ბზ	ბზ

ბზ- ბაქტერიული ზრდა

### 3.7 *R. solanacearum*-ის ფაგების მგრძობელობა ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მიმართ

ცნობილია, რომ ბაქტერიფაგების სტრუქტურული კომპონენტების შენებისა და ფუნქციონირების შეფასებისთვის დიდი მნიშვნელობა აქვს მათზე მთელ რიგ ფიზიკურ და ქიმიურ ფაქტორების მაინაქტივირებელი მოქმედების შესწავლას. სწორედ ამიტომ



შერჩეულ ფაგებზე შევისწავლეთ ტემპერატურის და წყალბად იონთა კონცენტრაციის გავლენა.

ბაქტერიოფაგების თერმოსტაბილობა შევისწავლეთ *R. solanacearum*-ის შერჩეულ 3 ფაგზე (R.s 3-1; R.s 6-3; R.s 4) სხვადასხვა ტემპერატურულ რეჟიმის (50°C; 60°C; 70°C) და ექსპოზიციის ფარგლებში. მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით შეიძლება ითქვას, რომ R.s 4 ფაგი მეტი თერმოსტაბილობით ხასითდება, ვიდრე R.s 3-1 და R.s 6-3 რომელთა სრული თერმული ინაქტივაცია ხდებოდა 70 °C 30წთ-ში.

**ცხრილი 6.** *R. solanacearum*-ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების თერმოინაქტივაცია

ფაგები	კონტროლი	50°C			60°C			70°C		
		15წთ	30წთ	60წთ	15წთ	30წთ	60წთ	15წთ	30წთ	60წთ
R.s 3-1	5X10 <sup>6</sup>	3X10 <sup>6</sup>	2,8X10 <sup>6</sup>	2X10 <sup>6</sup>	3,2X10 <sup>5</sup>	2,5X10 <sup>5</sup>	2,2X10 <sup>5</sup>	1X10 <sup>4</sup>	0	0
R.s 6-3	4X10 <sup>6</sup>	6X10 <sup>5</sup>	5X10 <sup>5</sup>	4X10 <sup>5</sup>	4X10 <sup>5</sup>	2X10 <sup>5</sup>	7X10 <sup>4</sup>	3X10 <sup>4</sup>	0	0
R.s 4	2X10 <sup>6</sup>	8X10 <sup>5</sup>	4X10 <sup>5</sup>	1X10 <sup>5</sup>	1X10 <sup>5</sup>	8X10 <sup>4</sup>	1,1X10 <sup>4</sup>	7X10 <sup>4</sup>	1X10 <sup>2</sup>	1X10 <sup>2</sup>

ბაქტერიოფაგების მგრძობელობა pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობაზე შევისწავლეთ *R. solanacearum*-ის შერჩეულ 3 ფაგზე (R.s 3-1; R.s 6-3; R.s 4). საკვლევი ბაქტერიოფაგების მჟავე-ტუტოვანი დენატურაციის ცდებმა გვიჩვენა რომ *R. solanacearum*-ის ფაგები საკმაოდ სტაბილურნი არიან pH4-7-ის პირობებში. pH-ის ექსტრემალურად დაბალი მნიშვნელობის დროს ნაწილაკების რაოდენობა მკვეთრად მცირდება. თუმცა R.s 4 ფაგი მცირე რაოდენობით მაგრამ მაინც ინარჩუნებს სიცოცხლის უნარიანობას 60 წუთი დაბალი pH-ის დროს, R.s 3-1; R.s 6-3 განსხვავებით. იგივეს ვერ ვიტყვით ტუტე არის შემთხვევაში. საკვლევი ფაგები ინარჩუნებენ სიცოცხლისუნარიანობას pH9 გარემოში.

**ცხრილი 7.** ბაქტერიოფაგების მგრძობელობა წყალბად-იონთა სხვადასხვა მნიშვნელობის მიმართ

ფაგები	კონტროლი	pH2			pH4			pH7			pH9		
		30წთ	60წთ	120წთ	30წთ	60წთ	120წთ	30წთ	60წთ	120წთ	30წთ	60წთ	120წთ
R.s 3-1	4X10 <sup>8</sup>	0	0	0	4X10 <sup>8</sup>	3X10 <sup>8</sup>	8X10 <sup>7</sup>	4X10 <sup>8</sup>	3X10 <sup>8</sup>	2.8X10 <sup>8</sup>	3X10 <sup>8</sup>	2X10 <sup>8</sup>	1.6X10 <sup>8</sup>
R.s 6-3	3X10 <sup>8</sup>	1	0	0	2.8X10 <sup>8</sup>	2.4X10 <sup>8</sup>	9X10 <sup>7</sup>	3X10 <sup>8</sup>	2.6X10 <sup>8</sup>	2.4X10 <sup>8</sup>	3X10 <sup>8</sup>	2X10 <sup>8</sup>	1X10 <sup>8</sup>
R.s 4	4X10 <sup>8</sup>	100	20	0	4X10 <sup>8</sup>	3.6X10 <sup>8</sup>	3.2X10 <sup>8</sup>	4X10 <sup>8</sup>	4X10 <sup>8</sup>	3.8X10 <sup>8</sup>	3.2X10 <sup>8</sup>	2.4X10 <sup>8</sup>	1.8X10 <sup>8</sup>

## 4 დასკვნა

- *Ralstonia solanacearum*-ის პეციფიკური ფაგების შესწავლამ გვიჩვენა განსხვავებული ფაგების არსებობა გარემოში.
- შერჩეული სამი *R. solanacearum*-ის ფაგის, ფართო ლიზისური სპექტრი, ხანგრძლივი ლიზისური სტაბილურობა თხიერ საკვებ არეში, ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორებისადმი მდგრადობა, აკმაყოფილებს ბიოლოგიური კონტროლისთვის გამოსაყენებელ ბაქტერიოფაგებისადმი წაყენებულ მოთხოვნებს.

## 5 გამოყენებული ლიტერატურა

1. Peeters N., A.Guidot, F. Vaillau, M. Valls *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol Plant Pathol.* 2013 Sep;14(7):651-62; doi: 10.1111/mpp.12038
2. Merabishvili M., J.P. Pirnay, G. Verbekenb, N. Chanishvili, M. Tediashvili, N. Lashkhi, V. Krylov, J. M., Luc Van Parys, R.Lavigne, G. Volckaert, W. Mattheusf, G. Verweenb, P.De Corteb, S. Jennesb, M. Zizie,g, D. De Vosb and M. Vanechoutteh. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE* 4(3): e4944. doi:10.1371/journal.pone. 0004944

3. Davitashvili M., M. Tediashvili,, T.Khukhunashvili. T. Koberidze, N.Lashkhi,G. Tsertsvadze, B. Khurzia, T. Chanishvili .Comparative study of potato bacteria pathogens isolated in 90's in Georgia:1. Morphological, physiological and pathogenic peculiarities .Proc. Georg.Acad. Sci.,2000,v.26, No 1-3, p. 331- 337.
4. Davitashvili M., M. Tediashvili, T.Khukhunashvili, N. Balardjishvili, T. Koberidze, N. Chanishvili, G. Tsertsvadze, T. Eliashvili. Comparative study of potato bacterial pathogens isolated in 90's in Georgia: 2. Susceptibility to antibiotics and specific bacteriophages, phage and plasmid content . Proc. Georg.Acad. Sci.,2000, v.26, No 1-3, p. 339-345.
5. Lashkhi N., T. Kokashvili, T. Eliashvili, T. Koberidze, G. Tsertsvadze, M. Muradashvili, G. Meparishvili, Z. Sikharulidze and M. Tediashvili. The isolation and biological characterization of bacteriophages lytic to Georgia strains of *Ralstonia solanaceum* race 3 biovar 2. (2018)ю Int. J. of Adv. Res.6 (2). 850-860] (ISSN 2320-5407).
6. Tediashvili, M. Davitashvili., N. Lashkhi ,T.Khukhunashvili. T. Koberidze, D.Giorkhelidze, G. Tsertsvadze,T. Chanishvili. Study of biological properties of some bacteriophages specific to phytopathogenic bacteria. Proc. Georg.Acad. Sci., 2001,v.27, No 1-3, p.45- 51.
7. Alexander Byth Carstens, Amaru Miranda Djurhuus, Witold Kot, Lars Hestbjerg Hansen. A novel six-phage cocktail reduces *Pectobacterium atrosepticum* soft rot infection in potato tubers under simulated storage conditions ,FEMS Microbiology Letters, Volume 366, Issue 9, May 2019, fnz101, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz101>
8. Álvarez B, López MM and Biosca EG (2019) Biocontrol of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Water and Host Plants by Novel Waterborne Lytic Bacteriophages. *Front. Microbiol.* 10:2813. Doi: 10.3389/fmicb.2019.02813
9. Hyeongsoon Kima, Minsik Kimb, Sam-Nyu Jeec, Sunggi Heud, Sangryeol Ryu. Development of a Bacteriophage Cocktail against *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *Carotovorum* and Its Effects on *Pectobacterium* Virulence. *AEM, BIOTECHNOLOGY* October 2022 Volume 88 Issue 19 e00761-22<https://doi.org/10.1128/aem.00761-22>
10. Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., and Momol, M. T. (2007). Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 245–262. Doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411

11. Kotorashvili A, Meparishvili G, Gogoladze G, Kotaria N, Muradashvili M, Zarandia M, Tsaguria D. Three Draft Genome Sequences of the Bacterial Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*, Isolated in Georgia. *Genome Announc.* 2017 Jun 8;5(23):e00480-17. doi: 10.1128/genomeA.00480-17. PMID: 28596403; PMCID: PMC5465622. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465622/> გადამოწმებულია: 6.07.2024.
12. Denny T. P., & Hayward, A. C. (2001). Gram-negative bacteria: *Ralstonia*. In N. W. Schaad, J. B. Jones, & W. Chun (Eds.), *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (pp. 151-174, 3rd edn). APS Press, St. Paul, M. N.
13. Kelman A, Jensen JH. Maintaining virulence in isolates of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 1951;41:185-187.
14. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2004; Diagnostic protocols for regulated pests Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés PM 7/21 34, 155157
15. Kelman A, Hruschka J. Role of motility and aerotaxis in selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum*. *J Gen Microbiol* 1973;76:177-188.
16. *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Quick Diagnostic Guide. Raymond O. García, Jim P. Kerns, and Lindsey Thiessen. Published: 22 Jan 2019 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHP-04-18-0015-DG> გადამოწმებულია: 6.07.2024.
17. Clough, S. J., Flavier, A. B., Schell, M. A. & Denny, T. P. (1997a). Differential expression of virulence genes and motility in *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* during exponential growth. *Appl Environ Microbiol* 63, 844–850
18. Liu HL, Kang YW, Genin S, Schell MA, Denny TP. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology* 2001; 147:32153229
19. Wang Z, Luo W, Cheng S, Zhang H, Zong J, Zhang Z. *Ralstonia solanacearum* - A soil borne hidden enemy of plants: Research development in management strategies, their action mechanism and challenges. *Front Plant Sci.* 2023 Feb 24;14:1141902. doi: 10.3389/fpls.2023.1141902. PMID: 36909396; PMCID: PMC9998985. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9998985/> გადამოწმებულია: 6.07.2024.

20. Boucher CA, Gough CL, Arlat M. Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. *Annu Rev Phytopathol* 1992; 30:443-461 .
21. Paudel S, Dobhal S, Alvarez AM, Arif M. Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. *Pathogens*. 2020 Oct 25;9(11):886. doi: 10.3390/pathogens9110886. PMID: 33113847; PMCID: PMC7694096. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7694096/> გადამოწმებულია: 6.07.2024.
22. Buddenhagen IW, Kelman A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol*, 1964; 2:203-230
23. მ. მურადაშვილი, გ. მეფარიშვილი, ზ. სიხარულიძე, ს. მეფარიშვილი “ფიტოპათოგენური ბაქტერიის- *Ralstonia solanacearum* გავრცელება საქართველოში.“ საქ. სოფ. მეურნ. მეცნ. აკადემიის მოამბე, # 33, p. 101– 104, 2014
24. Rasocha V., Hausvater E., Dolezal P., (edit.) *Harmful Agents of Potato*, Potato research Institute, Cz, 2008. Page 161.
25. Dick Vreugdenhil, John Bradshaw, Christiane Gebhardt, Francine Govers, Mark A. Taylor, Donald K.L. MacKerron, Heather A. Ross. *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Chapter 27 - Bacterial Pathogens of Potato. August 14, 2007
26. *The Potato Crop Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind*. Hugo Campos · Oscar Ortiz Editors page 351
27. Yuliar, Nion YA, Toyota K. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ*. 2015;30(1):1-11. doi: 10.1264/jsme2.ME14144. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25762345; PMCID: PMC4356456. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356456/> გადამოწმებულია: 6.07.2024.
28. Verhaegen M, Bergot T, Liebana E, Stancanelli G, Streissl F, Mingeot-Leclercq MP, Mahillon J, Bragard C. On the use of antibiotics to control plant pathogenic bacteria: a genetic and genomic perspective. *Front Microbiol*. 2023 Jun 27;14:1221478. doi: 10.3389/fmicb.2023.1221478. PMID: 37440885; PMCID: PMC10333595.

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10333595/>გადამოწმებულია: 6.07.2024.
29. მიკრობიოლოგია, ვირუსოლოგია: ლექციების კურსი / ნინო გაჩეჩილაძე.  
გამომცემლობა:[ქ.გ.],[გ.გ.],[წ.გ.]chrome-  
extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://digitallibrary.tsu.ge/book/2021/j  
uly/readers/gachechiladze\_mikrobiologia.pdf გადამოწმებულია: 6.07.2024.
30. Bacteriophages : biology and applications. Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze.p.  
cm. Boca Raton London New York Washington, D.C. pp. 528
31. Rogovski P, Cadamuro RD, da Silva R, de Souza EB, Bonatto C, Viancelli A, Michelon  
W, Elmahdy EM, Treichel H, Rodríguez-Lázaro D and Fongaro G . Uses of  
Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators.  
„Frontiers in Microbiology." Volume 12. 30 November 2021.  
[https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.793135/  
full](https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.793135/full) გადამოწმებულია: 6.07.2024.
32. Molecular Biology Author David Freifelder; Friefelder, Publisher Jones & Bartlett  
Publishers, Boston, MA, U.S.A. Pages 834
33. Крилов В.Н. Бактериофаги в микробиологической промышленности  
Промышленная микробиология. Москва, 1989
34. Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000.  
Brief review. Arch Virol. 2001;146(5):843-57. doi: 10.1007/s007050170120. PMID:  
11448025.
35. Крылов В.Н., Богуш В.Т., Шапиро Д. Бактериофаги Pseudomonas aeruginosa,  
Структуры ДНК которых сходна со сотруктурой ДНК фага Ми I. Сообщение  
Общее описание, локализация чувствительных к эндокуклеазам сайтов в ДНК.  
Структура гомодуплексов фага Д3112. Генетика 1980. Т. 16. №8/ с. 824-832.
36. Krylov V.N., Rebent ish B.A., Debarov V.G. Study on the restriction on DNA from a  
group of novel lambdoid bacteriophages by ECO R1 endonuclease. Molekularnaja  
Biologia (in Russian) 1977, v. 11, p. 820-825.