

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГА *ERWINIA AMYLOVORA*, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Е. А. Турков

Белорусский государственный университет, г. Минск;

egorturkov@tut.by;

науч. рук. – А.Л. Лагоненко, канд. биол. наук, доц.;

Н.В. Бесараб, ассист.

В ходе данной работы был выделен бактериофаг EP1, способный заражать клетки *Erwinia amylovora* и *Pantoea agglomerans*. На основании анализа морфологии капсида и последовательности фрагмента генома фаг EP1 был предварительно отнесен к семейству *Autographiviridae*.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*, бактериальный ожог, фитопатогены, бактериофаги

ВВЕДЕНИЕ

Фитопатогенная бактерия *Erwinia amylovora* является возбудителем бактериального ожога плодовых и отнесена к карантинным объектам стран Европейской Организации Защиты Растений. В Республике Беларусь бактериальный ожог был впервые выявлен в 2007 году [3]. Основными методами борьбы с этой болезнью являются применение антибиотиков и медьсодержащих препаратов. Однако, использование антибиотиков против патогенов растений ограничено, в связи с рисками развития устойчивости к антибиотикам у патогенов человека, а использование препаратов на основе меди приводит к ее накоплению в почве и отдельных частях растения [4]. На данный момент в фитопатологии развивается направление, связанное с использованием бактериофагов в качестве средства борьбы с фитопатогенами [2].

Целью данной работы является выделение бактериофагов *Erwinia amylovora* и их микробиологическая и молекулярно-биологическая характеристика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы, проверяемые на наличие бактериофага, инкубировали с индикаторным штаммом *Erwinia amylovora* 1/79Sm и на следующий день культуральную жидкость центрифугировали и супернатант проверяли на наличие бактериофага методом агаровых слоев по Грациа.

Титр фага определяли методом агаровых слоев (метод Грация). Для получения концентрированных препаратов частицы фага из фаголизита штамма *Erwinia amylovora* 1/79Sm осаждали путем добавления полиэтиленгликоля (мол. вес 6000) до 6 %-ной концентрации с последующим центрифугированием при 40000 g 30 мин. Осадок ресуспензировали в малом объеме ТЕ-буфера. Полученные суспензии использовали для выделения нуклеиновой кислоты бактериофага.

Спектр литического действия определяли путем нанесения капли суспензии бактериофага на газон испытываемого штамма, приготовленный методом агаровых слоев. Чашки инкубировали при оптимальной температуре в течение 24 ч.

Выделение ДНК из фаговых частиц осуществляли по следующей методике: к 100 мкл концентрированной суспензии бактериофага добавляли 100 мкл 0,5 моль/л ЭДТА и 1 мкл 10 % ДСН, перемешивали и инкубировали при 65 °С 15 мин. К лизату добавляли равный объем хлороформа, перемешивали 3 мин и затем разделяли фазы центрифугированием в течение 3–5 мин. Осторожно, не затрагивая белого осадка, отбирали водную (верхнюю) фазу и переносили в чистую пробирку, добавляли равный объем насыщенного буфером ТЕ фенола и тщательно перемешивали до образования однородной эмульсии. Разделяли фазы центрифугированием в течение 3 мин при 12000 g, аккуратно отбирали водную фазу в чистую пробирку. Добавляли равный объем охлажденного до –20 °С этанола и осаждали выпавшую в осадок ДНК центрифугированием 10 мин при 12000 g.

Ферментативные реакции с ДНК и гель-электрофорез проводили согласно стандартным методикам.

Для негативного контрастирования сконцентрированных высокоскоростным центрифугированием фаговых частиц использовался 3% раствор ацетата урана. Анализ морфологии частиц бактериофага проводился на просвечивающем электронном микроскопе Hitachi H-800 в НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ.

Вектор со вставкой фрагмента генома бактериофага был передан в Институт микробиологии НАН Беларуси Валентовичу Леониду Николаевичу для проведения секвенирования по Сенгеру. Секвенирование проводили на приборе Li-Cor 4300.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате данной работы был из образца огуречного рассола был выделен бактериофаг *Erwinia amylovora*. Выделенный бактериофаг (здесь и далее EP1) на индикаторной культуре формировал круглые,

прозрачные негативные колонии различного размера (1–2 мм в диаметре) с мутным, нечетким краем и без признаков вторичного роста (рис. 1). Многократные пассажи как крупных, так и мелких негативных колоний бактериофага приводили к одинаковому результату – формированию разнородных по размеру колоний. Для определения спектра литического действия фага EP1 были использованы коллекционные штаммы бактерий *Erwinia amylovora* и *Pantoea agglomerans*.

Исследуемый штамм	Бактериофаг EP1
<i>Erwinia amylovora</i> E2	+
E3	+
E4	+
E5	+
L-3-1	+
L-3-2	+
L-3-5	+
L-3-6	+
L-3-8	+
<i>Pantoea agglomerans</i> 194	-
197	-
198	+
216	+
219	-
220	-
221	-
222	+
228	-

Примечание. Подавление роста бактерий фагом обозначается знаком “+”, отсутствие наблюдаемого подавления роста – “-”.

Для определения систематического положения выделенного бактериофага была изучена морфология его частиц. По данным электронной микроскопии, EP1 – бактериофаг с икосаэдрической головкой (диаметр 65-70нм) и коротким несократимым хвостом (рис. 2). Исходя из полученных данных, фаг EP1 был отнесен к морфотипу C.

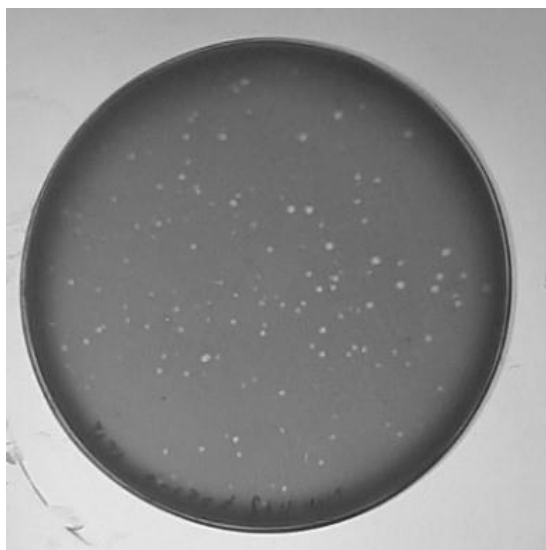


Рис. 1. Морфология негативных колоний бактериофага EP1

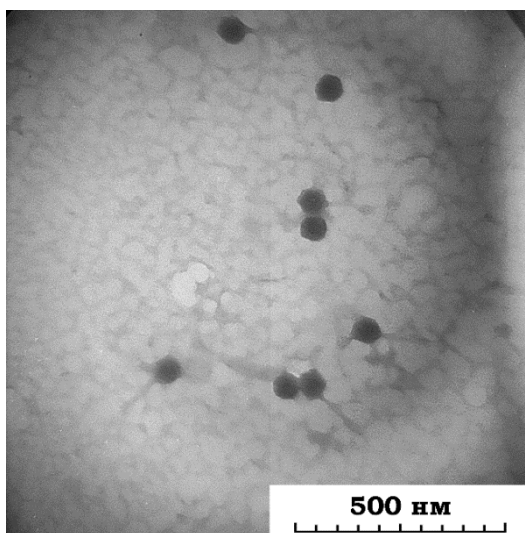


Рис. 2. Микрофотография фаговых частиц EP1, полученная на просвечивающем микроскопе Hitachi H-800

На следующем этапе работы, ДНК изучаемого бактериофага была очищена и подвергнута рестрикционному анализу с использованием ферментов PstI, HindIII, EcoRI, XhoI, BamHI. ДНК EP1 разрезалась лишь одной рестриктазой – EcoRI. Для выяснения систематического положения фага, фрагмент его генома был клонирован в векторе pUC18 и частично секвенирован. В результате была определена последовательность длиной 807 пар оснований, на 70,63% идентичная участку генома бактериофага LIMelight. Бактериофаг LIMelight на газоне бактерий *Pantoea agglomerans* образует мелкие негативные колонии диаметром 1мм, так же он способен поражать *Erwinia amylovora*. Его капсид представлен икосаэдрической головкой диаметром около 60 нм и коротким несократимым хвостом длиной около 12 нм,

относится к семейству *Autographiviridae* и имеет геном размером 44546 п.о. [1]. Исходя из полученных данных можно предположить, что выделенный в ходе данной работы бактериофаг EP1 также относится к семейству *Autographiviridae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы был выделен бактериофаг EP1. Было установлено, что данный фаг обладает литической активностью в отношении бактерий *Erwinia amylovora* и *Pantoea agglomerans*. Были получены микрофотографии фаговых частиц и секвенирован фрагмент генома фага размером 807 пар оснований. Исходя из данных, полученных в ходе молекулярно-генетического анализа, можно предположить, что бактериофаг EP1 относится к семейству *Autographiviridae*.

Выражаем отдельную благодарность Валентовичу Леониду Николаевичу за предоставление возможности секвенирования и Комарову Фадею Фадеевичу за предоставление возможности получения микрофотографий бактериофагов при помощи электронного микроскопа.

Библиографические ссылки

1. Adriaenssens, Evelien M., Pieter-Jan Ceyssens, Vincent Dunon, Hans-Wolfgang Ackermann, Johan Van Vaerenbergh, Martine Maes, Maurice De Proft, и Rob Lavigne. «Bacteriophages LIMelight and LIMEzero of *Pantoea Agglomerans*, Belonging to the “PhiKMV-Like Viruses”». *Applied and Environmental Microbiology* 77, вып. 10 (15 май 2011 г.): 3443–50.
2. Jones, J B, L E Jackson, B Balogh, A Obradovic, F B Iriarte, и M T Momol. «Bacteriophages for Plant Disease Control*», 2007 г., 20.
3. Lagonenko, A.L., Komardina, V.S., Nikolaichik, Y.A. and Evtushenkov, A.N. (2008), First Report of *Erwinia amylovora* Fire Blight in Belarus. *Journal of Phytopathology*, 156: 638-640.
4. McManus, Patricia S, Virginia O Stockwell, George W Sundin, и Alan L Jones. «ANTIBIOTIC USE IN PLANT AGRICULTURE», 2002 г., 27.