

Boyko A.A.¹, Zhuminska G.I.², Lukina A.V.², Zakernichnaya I.V.², Ivanytsia V.A.², Tovkach F.I.¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, Kyiv, Ukraine

²Odesa I.I. Mechnikov National University, Odesa, Ukraine

МОЖЛИВІСТЬ БІОКОНТРОЛЮ БАКТЕРІЙ АСОЦІЙОВАНИХ З РОСЛИНАМИ ЗА ДОПОМОГОЮ СПЕЦИФІЧНИХ БАКТЕРІОФАГІВ

*The work relates to the general problem of complex relationships in ecosystems involving pathogenic bacteria from the microbial community that accompanies the pathogenic process. The phage-cell relationship between virulent phages and *Pantoea agglomerans*, which is the most widespread bacteria, is established. The universal indicator system to identify phages of *Agrobacterium vitis* and *Erwinia amylovora* tree pathogens, based on *in situ* soil studies, is offered. Results of work are also about the presence of lysogenic state in *P. agglomerans*, *A. vitis*, *E. amylovora* and the creation of biotechnology to produce large quantities of bacteriophages using fermenter. The general scheme of obtaining bacteriophages can be expanded not only in plant pathology but also in medicine and veteranari.*

На сьогодні стан вивчення бактеріофагів фітопатогенних бактерій, які особливо небезпечні для агропромислового виробництва таких, як *E. amylovora*, *A. vitis* не дозволяє ефективно проводити біологічні заходи для боротьби і захисту від враження рослин опіком плодівих дерев і раком винограду. Фаги *E. amylovora* є важливим предметом вивчення, втім на сьогодні секвеновано і занесено до бази даних GenBank лише 11 геномів. Виділені і охарактеризовані 24 нових бактеріофага, вірулентні до бактерій *E. amylovora* [Born Y. et al., 2011]. Встановлено, що бактерії *E. amylovora* інфікують прокариотичні віруси з хвостовими відростками трьох основних родин *Myoviridae*, *Siphoviridae* і *Podoviridae* [Adriaenssens E.M. et al., 2011; Born Y. et al., 2011]. Представники цих родин складають 24,8%, 57,3%, і 14,2% від усіх бактеріальних вірусів, відповідно [Ackermann H.W., 2012]. Що стосується фагів *A. vitis*, то про їх природу та розповсюдження взагалі відсутня будь-яка інформація як у вітчизняній так і у зарубіжній літературі. Сучасний стан науки свідчить про те, що всі бактеріофаги, які персистують разом з важливою фітопатогенною бактерією *E. amylovora* вірулентними і не завжди активні щодо основного патогена [Tovkach F.I. et al., 2013; Tovkach F.I. et al., 2013; Faiduk Y.V., 2015]. Відомі фаги виділені з зазначених екологічних ніш мають різну морфологію [Müller I. et al., 2011, Roach D. R. et al., 2013; Meczer K., 2014] і первинну послідовність геному [Domotor D. et al., 2012]. Дані фаги є також полівалентними і вражають *P. agglomerans*, яка, як правило, супроводжує патоген.

Метою роботи був пошук нових вірулентних бактеріофагів як агентів біоконтролю для фітопатогенних бактерій *E. amylovora* і *A. vitis* із запровадженням нової універсальної системи на основі набору штамів *P. agglomerans* для індикації полівалентних вірулентних фагів деревних патогенів.

В роботі використані нові методологічні підходи які включали оригінальне ізолювання та ідентифікацію бактерій та бактеріофагів із місць ураження рослин патогенними бактеріями *E. amylovora* і *A. vitis*, а також розділення превалюючої і мінорної частини популяції бактеріофагів із застосуванням хроматографічного методу розділення (LPLC-хроматографія) за рахунок різної спорідненості вірусних часток до DEAE-целюлози. Дослідження проводили з використанням ряду індикаторних культур *P. agglomerans* g157, g157/RI, 9/7-2, g150 і *Erwinia amylovora* K8. Морфологія негативних колоній на даному штамі була найбільш чітко вираженою. Стійкі до фагів R-мутанти одержували, використовуючи максимальну концентрацію вірусу, яка складала 2×10^{10} БУО/мл, а також, концентрацію 2×10^9 . Для ідентифікації часток фагової природи використано їх електрофоретичне розділення в гелях

агарози. Ідентифікацію плазмід і фагів здійснювали за допомогою поліморфізму фрагментів рестрикції їх ДНК.

Після клонування на бактеріальних мутантах одержані чисті лінії 5-ти фагів. Дані фаги мали літичну природу та відрізнялись від превалуючих фагів за морфологією негативних колоній, які на мутантних штаммах утворювали чітко оформлені невеликі прозорі пляшки. За даними електронно-мікроскопічного аналізу дані вірулентні фаги були віднесені до родини *Siphoviridae* В1-морфотипу з нескоротливим хвостовим відростком. Характер розподілу рестрикційних фрагментів ДНК нових літичних фагів відрізнявся від таких KEY-подібних превалуючих бактеріофагів.

Література

1. Roach D.R. et al. Host exopolysaccharide quantity and composition impact *Erwinia amylovora* bacteriophage pathogenesis. In: Applied and Environmental Microbiology.- 2013. - Vol.79, № 10, P. 3249–3256.
2. Meczer K., Dömötör D., Vass J., Rakhely G., Schneider G., Kovacs T. The genome of the *Erwinia amylovora* phage PhiEaH1 reveals greater diversity and broadens the applicability of phages for the treatment of fibre blight // FEMS Microbiol Lett. – 2014. – Vol. 350, №1. – P. 25 – 27.
3. Dömötör D., Becsagh P., Rakhely G., Schneider G., Kovacs T. Complete genomic sequence of *Erwinia amylovora* phage PhiEaH2 // J. Virol. – 2012. – Vol. 86, №19, P. 10899.
4. Ackermann H. W., Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. In: Archives of Virology, 2012, Vol. 157, №. 10, P.1843-1849.
5. Müller I., et al. Molecular and physiological properties of bacteriophages from North America and Germany affecting the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. In: Microbial Biotechnology, 2011b, Vol.4, № 6, P. 735–745.
6. Born Y. et al. Novel virulent and broad-host-range *Erwinia amylovora* bacteriophages reveal a high degree of mosaicism and a relationship to *Enterobacteriaceae* phages. In: Applied Environmental Microbiology, 2011, Vol. 77, P.5945-5954.
7. Adrianssens E.M., Ceeysens P-J., Dunon V., Ackermann H. W., Vaerenbergh J.V., Maes M., De Proft M., Lavigne R. Bacteriophages LIME light and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, Belonging to the «phiKMV-Like Viruses» // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. Vol. 77, №10. – P. 3443 – 3450.
8. Tovkach F.I., Moroz S.N., Korol N.A., Faiduk Y.V., Kushkina A.I. Поливалентность бактериофагов, изолированных из плодовых деревьев, пораженных бактериальным ожогом // Мікробіологічний журнал – 2013. – 75, №2. – С. 80 – 88.
9. Tovkach F.I., Faiduk Y.V., Korol N.A., Kushkina A.I., Moroz S.N., Мучник Ф.В. Электронная микроскопия и рестрикционный анализ бактериофагов, изолированных из айвы и груши с симптомами бактериального ожога // Мікробіологічний журнал. – 2013. – 75, № 5.- С. 67 – 75.
10. Y.V. Faiduk, A.A. Boyko, F.V. Muchnyk, F.I. Tovkach Virion morphology and structural organization of polyvalent bacteriophages TT10-27 and KEY // Мікробіологічний журнал. – 2015. – 77, № 3.- С. 36 – 46.