

# ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР БАКТЕРИОФАГОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *ERWINIA AMYLOVORA*

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGE CULTURES ACTIVE AGAINST BACTERIAL PHYTOPATHOGEN *ERWINIA AMYLOVORA*

Бесараб Н.В.<sup>1</sup>, Лагоненко А.Л.<sup>1</sup>, Евтущенков А.Н.<sup>1</sup>, Мохавиков М.А.<sup>2</sup>, Мильчанин О.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, биологический факультет  
Республика Беларусь, г. Минск, ул. Курчатова, 10, 220045  
E-mail: natal-vasilna@rambler.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательское учреждение «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» Белорусского государственного университета  
Республика Беларусь, г. Минск, ул. Курчатова, 7, 220045

**Бактериальный ожог плодовых культур приносит большой экономический ущерб для плодового хозяйства, наиболее тяжело протекая на яблонях и грушах. Заболевание имеет широкое географическое распространение: случаи поражения *Erwinia amylovora* зафиксированы более чем в 40 странах мира, причем возбудитель *E. amylovora* имеет статус карантинного объекта в ряде стран. В качестве биологического способа контроля эпифитотий бактериального ожога могут служить специфические бактериофаги. Целью исследования являлось создание коллекции бактериофагов *E. amylovora* — потенциальных агентов контроля бактериального ожога плодовых культур. В задачи исследования входило выделение из образцов окружающей среды культур бактериофагов и поддержание жизнеспособности коллекции культур в лабораторных условиях культивирования. В статье приведены сведения по первичной характеристике морфологических и физиологических свойств новых бактериофагов, выделенных из различных регионов на территории Беларуси в 2017-2018 гг. Для бактериофагов Hena1, Hena2, Roscha1 и Dichka показан высокий уровень стабильности и литической активности при культивировании в лабораторных условиях и изучены их морфологические свойства, что позволило отнести их к семейству Myoviridae. Установлены необходимые органические добавки в питательную среду для культивирования бактериофагов Micant и Stean: 2,5 % сорбитол, 0,4% глицин или 2,5% глюкоза.**

**Ключевые слова:** бактериальный ожог, бактериофаги, *Erwinia amylovora*, антибактериальные агенты, биологический контроль.

**Для цитирования:** Бесараб Н.В., Лагоненко А.Л., Евтущенков А.Н., Мохавиков М.А., Мильчанин О.В. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР БАКТЕРИОФАГОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *ERWINIA AMYLOVORA*. *Аграрная наука*. 2019; (1): 127-130.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-1-127-130>

### Введение

Уже более двухсот лет известно заболевание плодовых и декоративных культур растений семейства *Rosaceae* — бактериальный ожог. Единственным возбудителем бактериального ожога является бактерия вида *Erwinia amylovora* (Burrill, 1883) Winslow et al., 1920, которая по настоящее время сохраняет статус карантинного объекта во многих странах мира. При благоприятных условиях для развития патогена вспышка инфекции может привести к гибели деревьев в течение сезона, что приносит большие экономические потери для плодового хозяйства. На сегодняшний день имеются профилактические и меры борьбы с бактериальным ожогом, которые включают законодательный контроль, агротехнические приемы, применение спреев химических агентов: антибио-

Besarab N.V.<sup>1</sup>, Lagonenko A.L.<sup>1</sup>, Evtushenkov A.N.<sup>1</sup>, Makhavikou M.A.<sup>2</sup>, Milchanin O.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Belarusian State University, Faculty of Biology  
Kurchatov str. 10, 220045 Minsk, Belarus  
E-mail: natal-vasilna@rambler.ru

<sup>2</sup> A.N. Sevchenko Institute of Applied Physics Problems  
Kurchatov str. 7, 220045 Minsk, Belarus

**Fire blight of fruit crops causes great economic damage to fruit production, most severely affecting on apples and pears. The causative agent, *Erwinia amylovora* is of quarantine concern in a number of countries of the world, moreover the disease has a wide geographic distribution: cases of *E. amylovora* defeat have been recorded in more than 40 countries. Specific bacteriophages can serve as a biological control method of the fire blight epiphytotics. The aim of the study was to create a collection of *E. amylovora* bacteriophages, potential agents for controlling fire blight of fruit crops. The objectives of the study included isolation of bacteriophage cultures from environmental samples and the maintenance of the viability of the culture collection under laboratory culture conditions. The article provides information on the primary characterization of the morphological and physiological properties of new bacteriophages isolated from different regions in Belarus in 2017-2018. A high level of stability and lytic activity was shown under laboratory cultivation for Hena1, Hena2, Roscha1 and Dichka bacteriophages. Using TEM, the morphology of bacteriophage particles was investigated, and Hena1, Hena2, Roscha1 and Dichka were attributed to Myoviridae family. The necessary organic additives to the nutrient medium for cultivation of bacteriophages Micant and Stean were established: 2.5% sorbitol, 0.4% glycine or 2.5% glucose.**

**Key words:** fire blight, bacteriophages, *Erwinia amylovora*, antibacterial agents, biological control.

**For citation:** Besarab N.V., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N., Makhavikou M.A., Milchanin O.V. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGE CULTURES ACTIVE AGAINST BACTERIAL PHYTOPATHOGEN *ERWINIA AMYLOVORA*. *Agrarian science*. 2019; (1): 127-130. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-1-127-130>

тиков (стрептомицин, окситетрациклин и гентамицин), медьсодержащих соединений, регуляторов роста (прогексадион кальция), а также биологический контроль: бактерии-антагонисты (*Pseudomonas agglomerans* и *Pseudomonas fluorescens*) и специфические бактериофаги [1]. Эффективность перечисленных подходов контроля зависит от различных факторов и имеет свои ограничения. Так, применение антибиотиков и медьсодержащих соединений вызвало появление резистентных к ним штаммов бактерий, кроме того, как медьсодержащие соединения, так антибиотики способны накапливаться в окружающей среде, создавая токсические условия обитания для живых организмов. С повышением нагрузки на окружающую среду, обусловленной сельскохозяйственной деятельностью, актуальным становится

переход к экологически дружественным технологиям ведения сельского хозяйства, или так называемому органическому сельскому хозяйству. Одним из вариантов реализации стратегии ведения органического сельского хозяйства является отказ от химических пестицидов, альтернативным вариантом для которых являются биологические способы борьбы с вредителями.

Использование бактериофагов как естественных антагонистов фитопатогенных бактерий представляет возможности контроля вредителя с помощью биологических средств. Благодаря таким свойствам препаратов на основе бактериофагов, как специфичность действия, способность к самовоспроизведению, быстрое разрушение в среде при отсутствии бактериальных клеток-мишеней, сравнительно несложная технология их получения, вирусы бактерий привлекают внимание многих исследовательских лабораторий. Анализ пригодности бактериофагов в качестве антибактериальных агентов демонстрирует положительные результаты. Например, при проведении экспериментов на яблонях была показана способность к перемещению бактериофагов по растению. При этом тяжесть симптомов бактериального ожога у саженцев яблонь снижалась как при обработке препаратом на основе бактериофагов корней растений, так и стеблей и листьев [2].

Целью исследования являлось создание коллекции бактериофагов *E. amylovora* — потенциальных агентов контроля бактериального ожога плодовых культур. В задачи исследования входило выделение из образцов окружающей среды культур бактериофагов и поддержание жизнеспособности коллекции культур в лабораторных условиях культивирования.

#### Объекты и методы

Объектами исследования служили новые культуры бактериофагов, проявляющие литическую активность в отношении штамма бактерии *E. amylovora* 1/79Sm (Германия, спонтанный Sm-резистентный мутант 1/79, Cotoneaster sp., 1979).

#### Условия культивирования.

Культивирование бактериофагов и бактерий-хозяев вида *E. amylovora* проводили при температуре 28 °С в питательной среде на основе пептона и дрожжевого экстракта (г/л: пептон — 10,0; дрожжевой экстракт — 5,0; NaCl — 8,5; вода дистиллированная до 1 л).

#### Выделение бактериофагов из образцов окружающей среды.

Для выделения бактериофагов получали их накопительные культуры: в колбу с питательным бульоном добавляли 2% ночной культуры индикаторного штамма бактерии и навеску образца почвы. Колбу оставляли на сутки при 28 °С. Далее после осаждения клеток бактерий из полученной суспензии накопительную культуру бактериофагов высевали на твердую питательную среду в присутствии индикаторного штамма бактерии.

#### Криоконсервация бактериофагов.

Лизат бактериофага вносили в стерильные пробирки объемом 1,5 мл, в качестве криопротектора использовали 10% глицерин. Хранение приборок с бактериофагом осуществляли в низкотемпературном холодильнике при –70 °С.

#### Электронная микроскопия частиц бактериофагов.

Анализ морфологии частиц бактериофагов проводили на просвечивающем электронном микроскопе Hitachi H-800 в НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ. Образец бактериофага концентрировали при помощи ультрацентрифугирования (35000×g в течение 1 часа), отмывали 0,1 М раствором ацетата аммония, затем концентрировали ультрацентрифугированием и ресуспендировали в дистиллированной воде. Суспензию бактериофага наносили на подложки из формвара. Для негативного контрастирования использовали 1% раствор фосфорновольфрамовой кислоты.

#### Исследование влияния добавок в среду культивирования на литическую активность бактериофагов.

Для проведения эксперимента использовали культуральные 6-луночные планшеты. Сорбитол, глицин или глюкозу вносили в расплавленную агаризованную питательную среду до конечных концентраций 2,5%, 0,4% и 2,5%, соответственно. Минеральные соли CaCl<sub>2</sub> и MgSO<sub>4</sub> вносили в расплавленную агаризованную питательную среду до конечной концентрации 10 мМ. На приготовленной среде титровали бактериофаг и на следующие сутки отмечали способность бактериофага формировать на среде негативные колонии.

#### Результаты и обсуждение

Бактериофаги, специфичные к бактериям вида *Erwinia amylovora* выделены из различных регионов на территории Беларуси в 2017–2018 гг.: Минская (бактериофаги Roscha1, Dichka, Micant), Гродненская (бактериофаги Hena1, Hena2) и Гомельская (бактериофаг Stean) области. Источником выделения служили образцы почвы, отобранные под яблонями и грушами. При посеве методом агаровых слоев на питательную агаризованную среду на основе пептона и дрожжевого экстракта исследованные культуры отличались характером формируемых негативных колоний. Негативные колонии можно было отнести к трем морфологическим типам: точечные (Hena1 и Stean); 1–2 мм в диаметре с неровными краями (Hena2, Roscha1, Dichka); 4–5 мм в диаметре с ореолом (Micant) (рисунком 1).

Для бактериофагов Hena1, Hena2, Roscha1 и Dichka при культивировании в жидкой питательной среде на основе пептона и дрожжевого экстракта были получены фаголизаты высокого титра (10<sup>10</sup> БОЕ/мл). Известно, что 30% бактериофагов являются чувствительными к консервирующему агенту хлороформу [3], в связи с чем проведены исследования влияния хлороформа на бактериофаги. При инкубировании в течение часа фаголизатов титром 10<sup>8</sup> БОЕ/мл в присутствии равного объема хлороформа для бактериофагов показана устойчивость к воздействию хлороформа. Бактериофаги заложены на

Рис. 1. Морфология негативных колоний бактериофагов *E. amylovora*, выделенных на территории Беларуси: а — Hena1; б — Roscha1; в — Micant



длительное хранение методом криоконсервации при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Результаты оценки их жизнеспособности после двух недель хранения представлены в таблице 1.

Как следует из полученных данных, после криоконсервации в присутствии протектора 10% глицерина бактериофаги сохраняют жизнеспособное состояние: падение титра происходит в пределах одного-двух порядков.

Морфология частиц бактериофагов Hena1, Hena2, Roscha1 и Dichka изучена с помощью электронной микроскопии. У бактериофагов были идентифицированы икосаэдрическая головка и хвостовой отросток. Средний размер головки бактериофага Hena1 составил 35 нм, бактериофага Hena2 — 26 нм, бактериофага Roscha1 — 44 нм и Dichka — 34 нм. Микрофотографии бактериофагов представлены на рисунке 2.

Исследованная морфология частиц бактериофагов характерна для представителей семейства *Myoviridae*. Следует отметить, что в настоящее время в литературных источниках среди выделенных бактериофагов *E. amylovora* описаны представители трех семейств порядка *Caudovirales*: *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae*. Бактериофаги *E. amylovora* семейства *Myoviridae*, выделенные на территории регионального муниципалитета Ниагара южного Онтарио и Королевского ботанического сада (Гамильтон, Онтарио), имели диаметр икосаэдрической головки от 53–71 до 84–114 нм [4]. Для изолятов бактериофагов *Myoviridae*, полученных на территории Швейцарии, диаметры капсидов составляли 67 и 77 нм, а длина хвостовых отростков — 124 и 116 нм, соответственно [5].

Представители *Myoviridae*, специфичные к бактериям вида *E. amylovora* и выделенные на территории Британской Колумбии, имели размеры головки от 48 до 80 нм и хвостовые отростки длиной от 74 до 136 нм [6]. Два миовируса, выделенные в Пейсоне в штате Юта, имели сравнительно крупные размеры: ширина капсида 143,2 нм и длина хвостового отростка 206,8 нм [7]. Анализ литературных и экспериментальных данных свидетельствует о достаточно широком диапазоне размеров вирусных частиц бактериофагов *E. amylovora*.

При размножении в среде на основе пептона и дрожжевого экстракта бактериофаги *Micant* и *Stean* отличались низкой эффективностью образования негативных колоний, а также жидких фаголизатов. Для сохранения и поддержания в активном состоянии бактериофагов *Micant* и *Stean* проведены исследования влияния на их литическую активность присутствия различных веществ в среде культивирования.

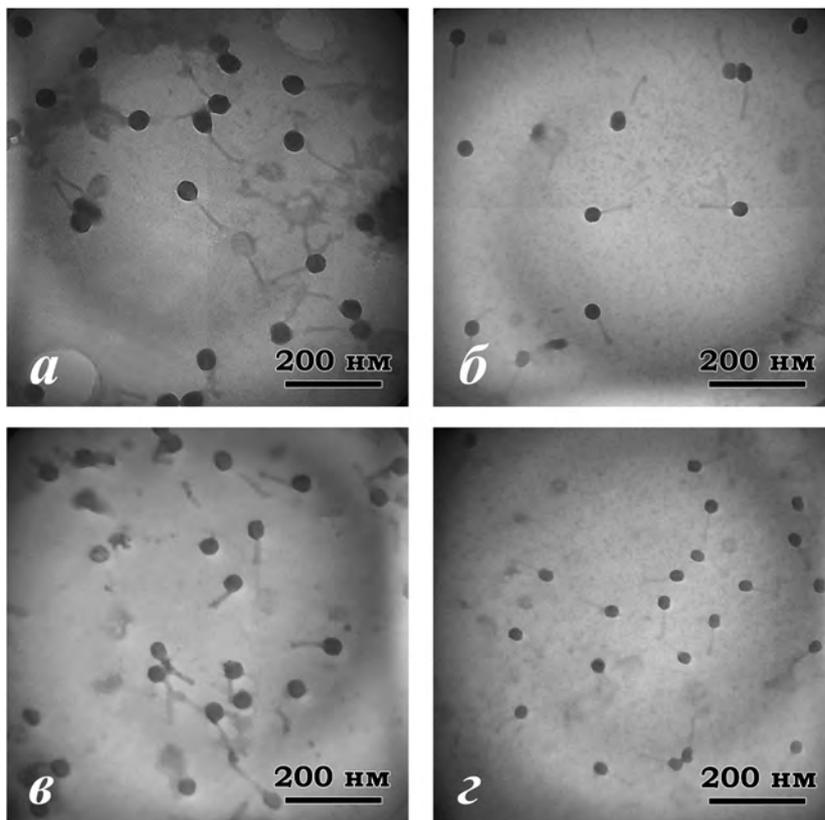
В качестве добавок минеральных солей изучены  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{MgSO}_4$  в концентрации 10 мМ. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в ряде

Таблица 1.

## Жизнеспособность бактериофагов при хранении методом криоконсервации

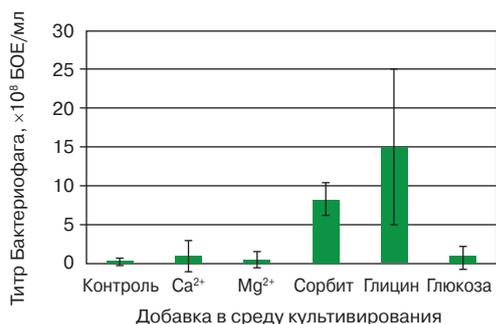
Название фага	Титр до криоконсервации, БОЕ/мл	Титр после криоконсервации, БОЕ/мл
Hena1	$1,3 \times 10^9$	$4 \times 10^8$
Hena2	$1,5 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^9$
Roscha1	$1,5 \times 10^{10}$	$4 \times 10^9$
Dichka	$4 \times 10^9$	$4 \times 10^9$

Рис. 2. Микрофотографии, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi H-800: а — Hena1; б — ena2; в — Roscha1; г — Dichka

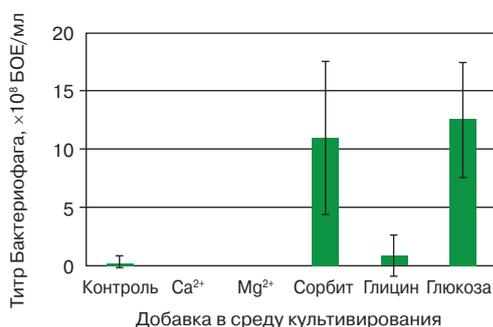


случаев являются кофакторами адсорбции бактериофагов [8]. Среди органических добавок в эксперименте использовали 2,5% сорбитол, 0,4% глицин и 2,5% глюкозу. Глюкоза представляет собой легко доступный источник углерода. Известно, что при росте культуры бактерии *E. amylovora* на среде, обогащённой сорбитолом, индуцируется продукция клетками бактерий экзополисахарида (ЭПС) — амиловорана [9]. ЭПС бактерий могут представлять физический барьер для проникновения вируса в бактериальную клетку, однако, известны бактериофаги, для которых ЭПС является субстратом связывания [10]. Анализ роли стимуляции продукции ЭПС представлял интерес при установлении возможного лимитирующего фактора взаимодействия бактериофагов *Micant* и *Stean* и клеток бактерий *E. amylovora*. Также в качестве потенциального агента увеличения эффективности размножения бактериофага рассматривали глицин. Показано, что добавление глицина в среду культивирования M17 позволяло наблюдать образование негативных колоний бактериофагами, неспособными к их формированию на стандартной среде M17 [11]. Из литературных данных следует, что глицин способен нарушать

**Рис. 3.** Литическая активность бактериофага *Micant* в присутствии в питательной среде минеральных солей и органических добавок



**Рис. 4.** Литическая активность бактериофага *Steal* в присутствии в питательной среде минеральных солей и органических добавок



### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Erwinia amylovora* (fireblight) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/21908> (дата обращения: 10.04.2019).
2. Nagy J.K., Schwarczinger I., Künstler A., Pogány M., Király L. Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple — a possibility of enhanced control of fire blight // *European Journal of Plant Pathology*. 2015. Vol. 142, № 4. P. 815–827.
3. Łobocka M.B., Glowacka A., Golec P. Methods for Bacteriophage Preservation // *Methods Mol Biol*. 2018. № 1693. P. 219–230. doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8\_17.
4. Gill J.J., Svircev A.M., Smith R., Castle A.J. Bacteriophages of *Erwinia amylovora* // *Applied and environmental microbiology*. 2003. Vol. 69, № 4. P. 2133–2138. doi:10.1128/AEM.69.4.2133–2138.2003.
5. Born Y., Fieseler L., Marazzi J., Lurz R., Duffy B., Loessner M.J. Novel Virulent and Broad-Host-Range *Erwinia amylovora* Bacteriophages Reveal a High Degree of Mosaicism and a Relationship to Enterobacteriaceae Phages // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. Vol. 77, № 17. P. 5945–5954.
6. Boulé J., Sholberg P.L., Lehman S.M., O'gorman D.T., Svircev A.M. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada // *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2011. Vol. 33, № 3. P. 308–317.
7. Arens D.K., Brady T.S., Carter J.L. et al. Characterization

### ОБ АВТОРАХ:

**Бесараб Н.В.**, аспирант  
**Лагоненко А.Л.**, кандидат биологических наук, доцент  
**Евтушенков А.Н.**, доктор биологических наук, профессор  
**Моховиков М.А.**, младший научный сотрудник  
**Мильчанин О.В.**, старший научный сотрудник

структуру клеточных стенок бактерий [12, 13]. На рисунках 3 и 4 представлены результаты 4 повторов экспериментов.

В ходе экспериментов обнаружено, что для повышения литической активности бактериофага *Micant* необходимым является добавление в среду глицина и сорбитола, тогда как для бактериофага *Steal* положительный эффект наблюдали при добавлении сорбитола и глюкозы.

### Выводы

На территории Беларуси выделены бактериофаги, специфичные в отношении фитопатогенной бактерии *E. amylovora*. Для бактериофагов отмечается гетерогенность их морфологических и физиологических свойств при их первичной характеристике.

Для бактериофагов Hena1, Hena2, Roscha1 и Dichka при культивировании в жидкой питательной среде на основе пептона и дрожжевого экстракта получили лизаты высокого титра, бактериофаги были устойчивы к воздействию хлороформа и криоконсервации при –70 °С. На основании результатов исследования морфологии частиц бактериофаги были отнесены к семейству *Myoviridae*.

Для культивирования бактериофагов *Micant* и *Steal* был оптимизирован состав питательной среды: добавление 2,5 % сорбитола, 0,4% глицина или 2,5% глюкозы в среду на основе пептона и дрожжевого экстракта позволяло повысить эффективность размножения бактериофагов.

of two related *Erwinia myoviruses* that are distant relatives of the PhiKZ-like Jumbo phages // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, №7. P. e0200202. doi: 10.1371/journal.pone.0200202.

8. Бактериофаги: биология и практическое применение: под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. Пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. А.В. Летаров. М.: Научный мир, 2012. С. 76.

8. Bacteriophages: biology and applications: Eds. E. Kutter, A. Sulakvelidze. Tr. from English by team of translators; scientific Ed. A.V. Letarov. M.: Nauchnyy mir, 2012. P. 76.

9. Bellemann P., Bereswill S., Berger S., Geider K. Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis // *Int J Biol Macromol*. 1994. Vol. 16, № 6. P. 290–296.

10. Roach D.R., Sjaarda D.R., Castle A.J., Svircev, A.M. Host exopolysaccharide quantity and composition impact *Erwinia amylovora* bacteriophage pathogenesis // *Applied and environmental microbiology*. 2013. Vol. 79, № 10. P. 3249–3256. doi:10.1128/AEM.00067–13.

11. Lillehaug D. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages // *Journal of Applied Microbiology*. 1997. Vol. 83, № 1. P. 85–90.

12. Hammes W., Schleifer K.H., Kandler O. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan // *Journal of bacteriology*. 1973. Vol. 116, №2. P. 1029–1053.

13. Hishinuma F., Izaki K., Takahashi H. Effects of Glycine and d-Amino Acids on Growth of Various Microorganisms // *Agricultural and Biological Chemistry*. 1969. Vol. 33, № 11. P. 1577–1586.

### ABOUT THE AUTHORS:

**Besarab N.V.**, PhD student  
**Lagonenko A.L.**, Ph.D., Associate Professor  
**Evtushenkov A.N.**, Dr. Professor  
**Makhavikou M.A.**, Junior Scientist Researcher  
**Milchanin O.V.**, Senior Scientist Researcher