

УДК 578.81

БІОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРІОФАГІВ, ВИДІЛЕНИХ В АНТАРКТИЦІ

О.В. Пугач, О.В. Мась, О.М. Андрійчук, В.П. Поліщук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01033, Україна, aom@univ.kiev.ua

Реферат. Проведено аналіз проб, наданих дослідниками Українських антарктичних експедицій, які було відібрано в 2003, 2004, 2005 та 2008 роках на території станції Академік Вернадський. Зразки аналізували на наявність бактеріофагів на лабораторних штамах фітопатогенних бактерій, що уражують культурні сільськогосподарські рослини та поширені в зонах з помірним кліматом. Виділено 58 ізолятів вірусів, проаналізовано їх літичну активність, морфологію та термін збереження в лабораторних умовах. На відміну від ізолятів фагів, виділених з агроценозів України, антарктичні фаги при збереженні схильні до швидкої інактивації. За результатами електронної мікроскопії виділені бактеріофаги було розділено на дві морфологічні групи за особливостями будови: i) фаги з ікосаедричною головкою та довгим нескоротливим хвостовим відростком (*Siphoviridae*, В1-морфотип) та ii) фаги з ікосаедричною головкою та коротким хвостовим відростком (*Podoviridae*, С1-морфотипу, порядку *Caudovirales*). Проведені дослідження заклали основу моніторингу бактеріофагів Антарктики. Це представляє інтерес для встановлення механізмів збереження популяції фагів в екстремальних умовах.

Ключові слова: екологія, Антарктика, екстремальні умови, бактеріофаги, віруси.

Abstract. This work is focused on phage isolation from moss and soil samples which were collected near the Ukrainian Antarctic Station "Academician Vernadsky" at the Argentina Islands in 2003, 2004, 2005 and 2008. Samples were analyzed for the presence of bacteriophages in laboratory strains of pathogenic bacteria affecting cultural agricultural crops and are widespread in temperate zones. Allocated 58 virus isolates, analyzed their lityc activity, morphology, and shelf life in the laboratory. Antarctic phages tend to rapid inactivation at their preservation, compared with isolates of phages that were isolated from agrocenosis of Ukraine. Electron microscopy studies revealed that isolated phages fall into two morphological groups characterized with: i) isometric heads and long non-contractile tail (relates to the *Siphoviridae* family, order *Caudovirales*); and ii) isometric heads and short non-contractile tail (relates to the *Podoviridae* family, order *Caudovirales*). The research laid the foundation for monitoring bacteriophage Antarctica. It is of interest to establish mechanisms to maintain the population of phages in extreme conditions.

Key words: ecology, Antarctica, extreme conditions, bacteriophages, viruses.

1. Вступ

Дослідження в Антарктиці спрямовані на комплексну характеристику біорізноманіття наземних та морських екосистем на всіх рівнях організації вивчення стратегій виживання антарктичних організмів під впливом екстремальних факторів. Одним із завдань є створення бази даних антарктичних організмів, адаптованих до екстремальних умов (низькі температури, УФ-опромінення, цикли замерзання та відтаювання тощо). З точки зору комплексного підходу до досліджень екосистем, увагу слід приділити й вірусам мікроорганізмів в Антарктиці.

Велика увага в дослідженнях приділялась вивченню вірусів тварин і птахів, місцевої фауни. Зареєстровано випадок IBDV у пінгвінів, антитіла до вірусу грипу та параміксовірусів виявлено в пінгвінів *Adelia* та антарктичних поморників.

Проте розповсюдженість вірусів серед рослинного світу Антарктичного континенту та субантарктичної зони мало досліджена. Це стосується й вивчення вірусів рослин, які уражують місцеву флору (Поліщук, 2010).

Активно досліджується мікробіологічне різноманіття Шостого континенту. Так, встановлено, що загальна кількість хемоорганотрофних аеробних мікроорганізмів складає 10^5 – 10^8 клітин/г зразка, що менше на 2-3 порядки, аніж у регіонах з помірним кліматом. Спостерігається тенденція зменшення кількості хемоорганотрофних мікроорганізмів в антарктичних біотопах у такому порядку (клітин/г зразка): ґрунт (1×10^6 – 5×10^7), трава *Deschampsia antarctica* (10^6 – 10^8), підземна частина моху (1×10^6 – 5×10^8), мул прісноводної водойми (10^5 – 10^7), надземна частина моху (10^3 – 10^6), лишайники (10^3 – 10^6). Більшість виділених антарктичних мікроорганізмів можна віднести до традиційних класичних таксонів, широко розповсюджених у різноманітних регіонах Землі з помірним кліматом, – до родів *Bacillus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Brevibacteriu*, тощо (Гаширевіч, 2009).

Комбінації специфічних стресових умов, таких як ізоляція, обмеженість поживних речовин, висушування та неіонізуюче опромінення навколишнього середовища, у мікробних угрупованнях створюють серйозні обмеження для поширення та збереження бактеріофагів мікробних ценозів.

Разом з тим дуже мало даних про фаги у ґрунтових шарах Антарктиди. У роботах, присвячених цьому питанню, аналізувалися зразки верхнього горизонту ґрунту та шару ґрунту, що прилягає до ризоїдів моху. В результаті досліджень було виділено велику кількість різних фагів. Ізольовані бактеріофаги відрізнялись за морфологією, що дало змогу їх класифікувати. Серед них було виявлено фаги, що належать до родини *Podoviridae* (С1-морфотип), родини *Siphoviridae* (В1-морфотип), родини *Myoviridae* (А1-морфотип). Концентрація всіх вищезазначених фагів у досліджуваних суспензіях становила приблизно 10^5 – 10^6 БУО/мл та була розрахована на основі щільності фагових частинок у різних полях зору на плівках-підкладках. Але до жодного з вищезазначених виділених фагів дослідникам не вдалося підібрати чутливого господаря. Чутливу бактеріальну культуру шукали на культурах *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Жиленков, Поліщук, 2007).

З огляду на це, метою роботи було виділити зі зразків ґрунту та моху, відібраних під час наукових експедицій, бактеріофаги та охарактеризувати їх.

2. Матеріали та методи досліджень

Нами було проаналізовано зразки ґрунту та моху, відібрані під час сезонних робіт у 2003, 2004, 2005 та 2008 роках на архіпелагу Аргентинські острови в місці знаходження Української антарктичної станції Академік Вернадський. Зразки відбирали та зберігали в стерильних поліетиленових пакетах в морозильній камері. Всі подальші дослідження проводились після доставки в Україну.

На літичну активність зразки перевіряли на індикаторних штаммах бактерій. У роботі використовували культури фітопатогенних бактерій, люб'язно надані відділом фітопатогенних бактерій (колекція музею Інституту мікробіології та вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного).

5 г матеріалу стерильно відбирали та вносили в 50 мл 0,1 М трис-НСІ буфера. Фільтрат центрифугували 32 тис. об/хв, 100000g 2 години. Осад з кожної пробірки ресуспендували в 0,5 мл 0,1 М трис-НСІ буфера (рН 7,0). Бактеріальні посіви зразків проводили на МПБ та МПА (1,5% та 0,7%).

Чисті лінії бактеріофагів отримували шляхом шестикратного пасування з використанням методом виколування окремих негативних колоній. Отримані ізоляти фагів використовували надалі для напрацювання їх у препаративних концентраціях та об'ємах.

Для вирощування бактерій та титрування фагів використовували готові комерційні агаризовані поживні середовища на основі рибного гідролізату (виробник – Оболенськ, ГРМ-агар, ГРМ-бульйон).

Розведення фагів проводили на 0,9% розчині NaCl (фізіологічний розчин) або комерційному м'ясному бульйоні, приготованому згідно з інструкцією підприємства-виробника. Титри визначали в бляшкоутворюючих одиницях в мл (БУО/мл) методом двошарового агару за Грація. Очистку проводили центрифугуванням у градієнті щільності хлористого цезію ($1,4 - 1,6 \text{ г/см}^3$) при 80000 г протягом 3 год.

Електронномікроскопічні дослідження проводили на електронному мікроскопі EM-125 при напрузі 60 кіловольт та інструментальному збільшенні 30000.

3. Результати та обговорення

Ізоляти фагів зі зразків були виділені до сімнадцяти індикаторних культур фітопатогенних бактерій: *Erwinia carotovora* 216, *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 1025, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 223, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 185, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 8646, *Pseudomonas chlororophis* 8612, *Burkholderia gladiob* pv. *allicola* 8494, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 4228, *Pseudomonas syringae* pv. 4013, *Pseudomonas viridiflava* 8867, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 8545, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8653, *Paenibacillus polymyxa* 9034, *Pseudomonas viridiflava* 8868, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7591, *Agrobacterium tumefaciens* 8626.

При первинному виділенні бактеріофагів їх літична активність проявлялась до шести бактеріальних культур: *Erwinia carotovora* 216, *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 1025, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 8646, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 4228, *Pseudomonas fluorescence* 8573.

При тривалому збереженні ізолятів протягом п'яти років при температурі 4°C відбувалася інактивація фагів. Тестування на збереження активності проводили на трьох бактеріальних культурах: *Erwinia carotovora* 216, *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 1025.

Ізоляти фагів зі зразків 2003 року (22 зразки) після збереження не проявили літичної активності на жодній з вищезазначених культур.

Дослідження інфекційної активності фагів зі зразків 2004 року показали, що з усіх ізолятів зберегла активність лише частина зразків (~27%), виділених на чутливій культурі *E. carotovora* 216 (титри склали $10^3 - 10^4$ БУО).

Виділені бактеріофаги за 2005 рік демонстрували активність до трьох досліджуваних індикаторних культур: *Erwinia carotovora* 216, *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 1025. Отримані титри становили $10^3 - 10^6$ БУО. Серед досліджуваних зразків були наявні ізоляти, що при первинному виділенні проявляли активність на чутливих культурах *E. carotovora* 216 та *Ps. syringae* pv. *atropaciens* 1025. Однак після тривалого зберігання при температурі 4 °C активність проявилась лише на культурі *E. carotovora* 216. Це можна пояснити тим, що ці зразки являли собою суміш фагів, активних до різних бактеріальних культур, але в процесі тривалого зберігання при 4 °C один з вірусів втратив інфекційну активність і зразки були чутливі вже лише до однієї бактеріальної культури.

Для дослідження спектру ліричної активності ми відібрали 8 ізолятів фагів. При дослідженні зразків було визначено спектр їх літичної активності на 17 штамів культур фітопатогенних бактерій: *Erwinia carotovora* 216, *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 1025, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 223, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 185, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 8646, *Pseudomonas chlororophis* 8612, *Burkholderia gladiob* pv. *allicola* 8494, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 4228,

Pseudomonas syringae pv. 4013, *Pseudomonas viridiflava* 8867, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 8545, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8653, *Paenibacillus polymyxa* 9034, *Pseudomonas viridiflava* 8868, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 7591, *Agrobacterium tumefaciens* 8626. Серед восьми досліджених зразків три ізоляти виявились моновалентними – чутливими до культур *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 1025, а п'ять зразків проявляли себе як суміш вірусів і були активними до кількох індикаторних культур (таблиця).

З проб моху та ґрунту, відібраних під час сезонних робіт у 2008 році, було взято по 10 зразків ґрунту та моху, які аналізували на наявність бактеріофагів.

Таблиця. Спектр літичної активності на 17 штаммах фітопатогенних бактерій

Індикаторні культури \ Ізоляти фагів	1025/1	1025/2	7325/14	A/15	A/3	A/10	A/11	216/23
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>beticola</i> 7325	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> 216	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 1025	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4228	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 8653	+	-	-	-	+	-	-	-

При посіві на МПА, при первинному виділенні вірусів, спостерігали літичну реакцію на двох чутливих бактеріях *E. carotovora* 216, *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325. Інші випробувані культури, які використовувались у дослідженнях, *E. coli* Ln109 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* 1025, виявились нечутливими. Для фагів, що виявляли літичну активність, було характерно утворення типових дрібних негативних колоній діаметром 0,5–1мм, число яких коливалось від 1 до 10 бляшкоутворюючих одиниць в мл (БУО/мл) (рис. 1). Було проведено не менше шести пасажів. Наступні пасажі привели до підвищення титрів фагів до 10⁶ БУО/мл.

Для всіх виділених ізолятів фагів отримано чисті лінії: зразки №3 (мох на культурі 7325), №4 (мох на культурі 7325), №8 (ґрунт на культурі 7325), №9 (ґрунт на культурі 7325) та №11 (суміш ґрунту на культурі 216) – і визначено спектр літичної активності на 12 бактеріальних культурах: *P. syringae* pv. *tabaci* 223, *E. carotovora* 216, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 1025, *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325, *P. syringae* pv. *aptata* 185, *P. syringae* pv. *tabaci* 8646, *P. chlororophis* 8612, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *P. syringae* pv. *syringae* 8653, *P. fluorescens* 8573, *Paenibacillus polymyxa* 9034. Усі досліджувані фаги виявились моновалентними, тобто чутливими лише до однієї бактерії-хазяїна, на яких були виділені, – *E. carotovora* 216 та *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325.

Фаги виявляли різноманіття за особливостями будови, що дало можливість віднести їх до таксономічних груп відповідно до рекомендацій Міжнародного комітету по Таксономії вірусів (рис. 2). Серед фагів були виявлені:

- фаги з ікосаедричною головкою та коротким хвостовим відростком, віднесені до родини: *Podoviridae*, C1 морфотипу, порядку *Caudovirales* (зразок №11).

- фаги з ікосаедричною головкою та довгим нескоротливим хвостовим відростком, віднесені до родини: *Siphoviridae*, B1 морфотипу, порядку *Caudovirales* (зразки №3, №4, №8, №9).

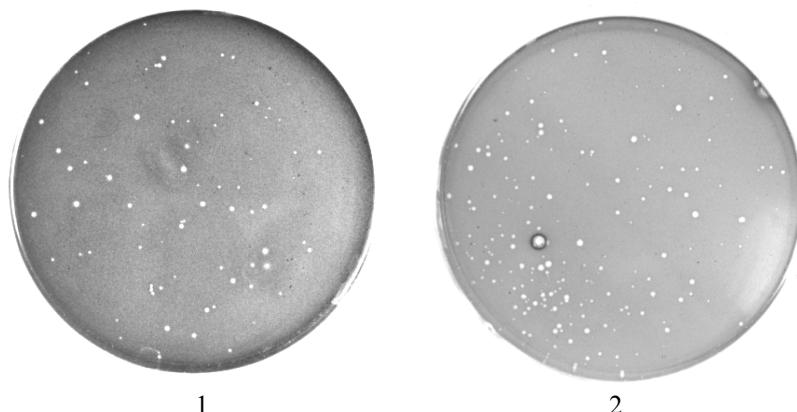


Рис. 1. Морфологія негативних колоній фагів: 1) *Erwinia carotovora* 216 (зразок № 11, 2008); 2) *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* 7325 (зразок №4).

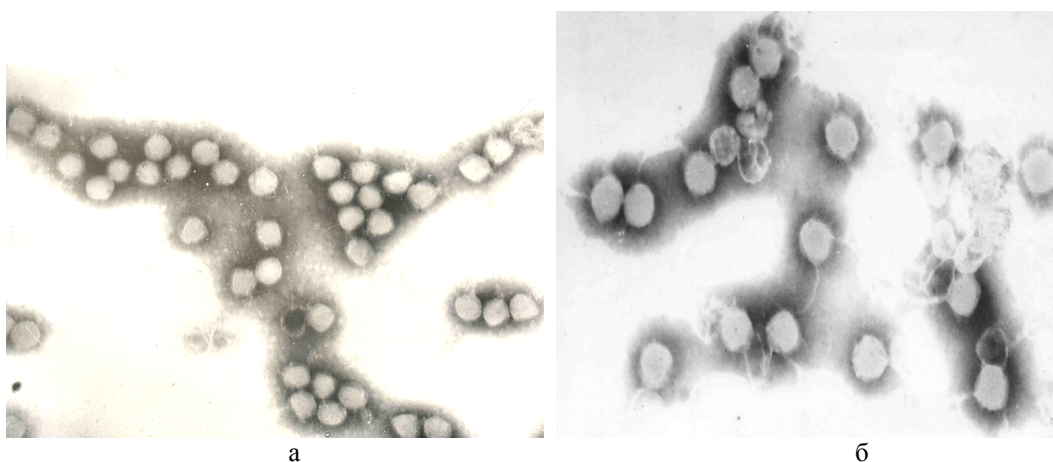


Рис. 2. а) бактеріофаги зразка № 11 на чутливій культурі *E. carotovora* 216; б) бактеріофаги зразку №9 на чутливій культурі *X. axonopodis* pv. *beticola* 7325. Інструментальне збільшення 30000.

4. Висновки

Зі зразків моху та ґрунту, відібраних в районі Антарктичної станції Академік Вернадський на архіпелагу Аргентинські острови в 2003, 2004, 2005 та 2008 рр., виділено 58 ізолятів вірусів, що зберегли літичну активність до ряду фітопатогенних бактеріальних культур, типових для зон з помірним кліматом.

Інактивація фагів є складним процесом, пов'язаним з пристосуванням до виживання бактерій у зовнішньому середовищі. З часом біологічна активність фагів супроводжується поступовою втратою титрів. Антарктичні фаги схильні до швидкої інактивації за умов їх збереження, порівнюючи з ізолятами бактеріофагів, які були виділені з агроценозів України. Швидка втрата активності антарктичних вірусів також може бути пов'язана з відсутністю постійного пасування, через що активність втрачається швидше.

Циркуляція фагів у природі може йти зі зміною чутливих господарів. Не виключено, що в результаті генетичної рекомбінації утворюються нові форми фагів, які проявляють літичну активність до раніше нечутливих до них бактеріальних культур.

Активність бактеріофагів до фітопатогенних бактерій зон помірного клімату може свідчити про наявність на континенті близькоспоріднених мікроорганізмів або про те, що в жорстких умовах віруси адаптуються до розповсюдження та збереження в біоценозах, утворюючи в результаті генетичної рекомбінації нові форми фагів, які проявляють літичну активність до раніше нечутливих до них бактеріальних культур.

За результатами електронної мікроскопії виділені фаги були віднесені до таксономічних груп за особливостями їх будови (*Siphoviridae*, В1-морфотипу та *Podoviridae*, С1-морфотипу, порядку *Caudovirales*).

Проведені дослідження заклали основу моніторингу бактеріофагів Аргентинських островів. Бактеріофаги, активні до нетипових бактерій, можуть бути основою для вивчення механізмів поширення фагів у ценозах.

Автори висловлюють подяку Національному антарктичному науковому центру Державного комітету України з питань науки, інновацій та інформатизації за надання зразків для досліджень та підтримку.

Список літератури

1. **С.В. Долгорукова, І.Г. Будзанівська, Ф.П. Дем'яненко, В.П. Поліщук.** Скринінг вірусних антигенів у рослинах *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis* // Український антарктичний журнал. – 2010. – №9. – С. 187–193.

2. **Таширев А.Б., Романовская В.А., Рокитко П.В., Черная Н.А., Шилин С.О., Таширева А.Б., Кобзарь Л.И.** Микробиологический анализ наземных биотопов Антарктики // IV Міжнародна Антарктична Конференція. – Київ, 2009. – С. 107.

3. **Е.Л. Жиленков, М.Е. Жиленков, Л.Ю. Завальский, В.П. Полищук.** Фаги в почвенных образцах Антарктиды // V Міжнародна конференція «Біоресурси та віруси». – Київ, 2007. – С. 154.