

Выделение ризобифагов и определение их литической активности

Прохорова В.А.1, Козлова А.П.2, Пастухова Н.Д. 1

1 - Университет ИТМО, Санкт-Петербург

2 – ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург-Пушкин, ш. Подбельского д.3

Ризобифаги – это бактериофаги, избирательно заражающие клубеньковые бактерио-микросимбионты растений группы перекрестной инокуляции люцерны. Ризобифаги классифицируют в соответствии с механизмом их взаимодействия с бактериальной клеткой, выделяют: вирулентные (литические) бактериофаги, которые вызывают лизис бактерии, сопровождающийся высвобождением зрелых фаговых частиц; и умеренные (или лизогенные) бактериофаги, которые обратимо встраивают свой геном в геном бактерии-хозяина и долгое время существуют в форме профага. Многие фаги могут переходить от литического цикла к лизогенному и обратно при изменении условий окружающей среды. Ризобифаги широко распространены в почвах, характеризующихся наличием большого количества и высоким разнообразием клубеньковых бактерий, что наблюдается особенно в центрах разнообразия их растений хозяев. При этом, фаги могут влиять на состав популяций бактерий, например, вызывая снижение численности фагочувствительных изолятов, или же могут являться одним из факторов генетической изменчивости, ризобий, например, участвуя в процессах горизонтального переноса генов. Целью нашей работы являлось выделение ризобифагов из почвенных образцов и изучение их морфо-биологических свойств, проявляющихся при заражении природных штаммов *Sinorhizobium meliloti*.

Ризобифаги выделяли из почв, отобранных в Переднеазиатском центре разнообразия бобовых растений, с использованием метода агаровых слоев по Адамсу (Swanstrom, Adams, 1951). В качестве тест-штамма использовали штамм *S. meliloti* L5-30, в геноме которого отсутствуют профаги. Литические свойства бактериофагов проверяли на 8 штаммах *S. meliloti* из рабочей коллекции лаб. генетики и селекции микроорганизмов ФГБНУ ВНИИСХМ, выделенных из тех же образцов почв, которые были взяты для выделения ризобифагов. Культивирование бактерий проводили при 28°C на питательной среде TY (Beringer et al., 1974). Для улучшения адсорбирования фагов на бактериальных клетках и их внутриклеточного роста в среду добавляли раствор CaCl₂ (2 мМ). Для увеличения визуальной контрастности бляшкообразующих единиц (БОЕ) в питательную среду добавляли 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (300 мг/мл).

По результатам работы выделено 2 ризобифага. Фаги контрастно различались по морфологическим характеристикам БОЕ на газоне тест-штамма L5-30, описаны: маленькие (точечные), прозрачные; колонии диаметром 2-3 мм с точечным прозрачным центром, окруженные зоной неполного лизиса; крупные прозрачные колонии диаметром около 1 см с четкими краями. Проанализированы литические свойства ризобифагов, показано, что они различались по спектру лизируемых природных штаммов *S. meliloti*. Оба фага были способны лизировать 2 из 8 штаммов *S. meliloti*. Кроме того выявлено 2 штамма *S. meliloti* резистентных по отношению к обоим исследованным фагам. В рамках работы были выделены нуклеиновые кислоты изучаемых фагов и проведен их рестрикционный анализы. Показано, что выделенные ризобифаги различались по рестрикционным профилям.

Таким образом, в рамках работы впервые выделены ризобифаги из почв, отобранных в центре разнообразия растений люцерны. Показано, что выделенные ризобифаги различаются по морфологическим характеристикам, по спектру лизируемых бактерий и рестрикционным профилям ДНК. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №[17-16-01095](#).