

9. Calendar R. The bacteriophages. 2nd — Oxford ; New York : Oxford University Press, 2006. — xiii, 746 p.

10. Kutter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages : biology and applications. — Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. — 510 p.

## A NOVEL COLIPHAGE PHIKT, CLOSELY RELATED TO CAULOBACTER PHAGE CD1: GENOME ANNOUNCEMENT

*Kulikov, E. E., Tarasyan K. K., Golomidova, A. K., Prokhorov, N. S., Isaeva, A. S., Strotskaya A. V., Tatarsky, E. V., Letarova, M. A., Kutuzova, N. M., Klunova, S. M., Letarov A. V.*

**Keywords:** *bacteriophage genome, Caulobacter crescentus, Escherichia coli, phiKT*

*A preliminary analysis of genome structure of the novel coliphage phiKT, isolated from horse feces, was performed. It has a very strong genetic affinity with Caulobacter phage Cd1, including high nucleotide homology of nearly all of its structural protein genes and nucleic acid metabolism genes. This is a very unusual finding, showing the ability of some phages to adapt to the host bacteria of different phylogenetic classes by changes of some of the genes outside of the core region of phage genome.*

УДК 578.81

## ТРАНСДУКЦИЯ ПЛАЗМИД БАКТЕРИОФАГАМИ Т4-ТИПА (ОБЗОР)

*Зимин А.А., кандидат биологических наук  
ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К.Скрябина РАН  
zimin@ibpm.pushchino.ru*

**Ключевые слова:** *бактериофаги Т4-типа, горизонтальный перенос генетической информации, фаговая трансдукция*

*Для изучения трансдукции плазмид бактериофагами Т4-типа были проведены следующие эксперименты. Была исследована трансдукция в природных условиях – в кишечнике лабораторного животного – мыши. Было проведено изучение трансдукции плазмид в отсутствии селекции антибиотиком и изучение трансдукция низкокопийных плазмид.*

*Работа была поддержана грантами РФФИ: №07-04-01563а, №08-04-10149-к, №08-04-99111офи\_р, №09-04-90824-моб\_ст, 13-04-00991-а.*

**Введение.** Бактериофаг Т4 дикого типа не способен осуществлять трансдукцию, так как содержит гидроксиметилцитозин вместо цитозина в своей ДНК и его геном кодирует ферменты, которые разрушают цитозиновую ДНК бактерии. Для мутантов бактериофага Т4, со-

держащих цитозиновую ДНК, была показана способность к трансдукции плазмидной ДНК [1-3]. Трансдукция плазмид была показана и для природных бактериофагов T4-типа, содержащих цитозин, так называемых псевдо – T – четных бактериофагов: RB42, RB43, RB 49 [4-6]. В этих исследованиях было показано, что трансдукция плазмид приводит к появлению псевдолизогенных клонов трансдуктантов на твердой агаризированной среде, содержащей антибиотик. В ходе этого процесса геном плазмиды может как оставаться интактным, так и претерпевать изменения. Могут происходить, например, делеции части плазмиды или образовываться плазмиды большей длины. В ходе этих исследований были получены плазмиды большего размера, чем исходная, которые могли образоваться за счет включения фаговой ДНК в плазмидный геном. Исследование изменений, индуцируемых процессом трансдукции в геномах плазмиды, фага и бактерии могут пролить свет на роль этого процесса в эволюции бактериального генома, а также существенны для развития технологии конструирования новых препаратов для фаговой терапии. Кроме этого нас интересовал вопрос можно ли отобрать плазмидосодержащие клоны-трансдуктанты на среде без селективного антибиотика и трансдуцировать природные плазмиды со строгим контролем копийности. Исследования трансдукции в природных условиях были проведены с использованием лабораторных животных.

**Трансдукция в природных условиях. Трансдукция маркера антибиотикорезистентности к ампицилину в лабораторный штамм E.coli в кишечнике мышей [7].** Было получено несколько трансдуцирующих фагов. Был установлен их титр на С600, а также частота трансдукции в штамм CR204, устойчивый к канамицину. Для использования в эксперименте с животными был выбран вариант RB43/pET15b, как обладающий наиболее лучшими показателями. Был поставлен эксперимент по трансдукции плазмиды pET15b фагом RB43/pET15b в штамм CR204 в кишечнике мыши. Для этого вводили по 150 мкл клеток. Через 6 часов вводили 150 мкл фага с множественностью 1 в первом опыте и 100 во втором. Количество клеток к этому моменту принимали за  $10^5$ . Пробы отбирали через 2, 3, 4 часа после введения фага.

Данный эксперимент показал, что в выбранных нами условиях (количество введенных клеток и фаговых частиц, а также выбранное нами время взятия пробы) можно наблюдать трансдукцию маркера антибиотикорезистентности плазмиды.

**Таблица 1 - Результаты трансдукции маркера антибиотикорезистентности к ампицилину в лабораторный штамм E.coli в кишечнике лабораторных мышей.**

Антибиотик, V пробы (мл)	Множественность фага - 1			Множественность фага - 100		
	2 часа	3 часа	4 часа	2 часа	3 часа	4 часа
Кан., 01	$1,7 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^3$	9	14	800	141
Амп.+ Кан., 0,1	3	1	0	1	7	0
Амп.+ Кан., 0,1	96	5	1	18	138	2
Амп., 0,1	8	0	0	3	22	0

Частота этого процесса выше при множественности заражения 100. При этом больше всего трансдуктантов высевается через 3 часа после введения фага. В то время, как при множественности заражения 1, больше всего клонов, имеющих устойчивость к двум антибиотикам, высевается через 2 часа после введения фага. Кроме того, по результатам этого опыта видно, что клетки штамма-реципиента сохраняют свою жизнеспособность и остаются в достаточном количестве и через 9 часов после введения.

**Исследование трансдукции плазмид в отсутствие селекции антибиотиком [7].** Бактериофагом RB43 были заражены клетки штамма E.coli С600, содержащие плазмиду pBR322. Полученным лизатом заражали клетки этого же штамма в экспоненциальной фазе

роста. Инфекцию проводили с множественностью 0,1. Зараженные клетки высевали на твердую среду, как содержащую антибиотик, так и без антибиотика. На среде содержащей антибиотик выросло 49 клонов, а на среде без антибиотика 168 клонов. Определение титра клеток без заражения фагом соответствовало данным плотности культуры. Заражение фагом приводило к снижению титра примерно в  $10^5$  раз. Повтор этого опыта неоднократно приводил к появлению клонов выживших после заражения на среде без антибиотика. Пересев данных клонов на среду, содержащую ампицилин показал, что от 50 до 75% клонов устойчивы к ампицилину или тетрациклину, а примерно 25% - 40% клонов устойчивы к обоим антибиотикам. Аналогичные опыты были проведены с бактериофагами RB42, RB 49 и было показано, что и в отсутствие антибиотика можно получить отдельные клоны-трансдуктанты. Данные клоны выросли в присутствии бактериофага на поверхности агаризованной среды и могли бы быть просто устойчивыми к бактериофагу клонами, отобранными в таких условиях. Проверка пересейанных на новые чашки с твердой средой клонов на устойчивость к фагу показала, что из 6 проверенных все оказались чувствительны к фагу  $\phi$ VZ7. **Скорее всего, псевдолизогенные клоны-трансдуктанты, образующиеся на среде в присутствии фага в данных условиях проявляют временную устойчивость к нему, а наличие этого свойства служит селективным фактором для их отбора.**

Было проведено исследование плазмидной ДНК, содержащейся в полученных трансдуктантах. Для этого были взяты клоны с исходной чашки с твердой средой без антибиотика, на которой они были получены. Эти клоны были пересейаны также на твердую среду уже содержащую ампицилин в концентрации 50 мкг на мл. Из 18 пересейанных клонов выросло только 15. Клоны были пересейаны еще раз, при этом наблюдался лизис части посева как в начале, так и конце «штриха», в некоторых случаях росли только отдельные колонии. Лизис культуры мог быть связан и с наличием внеклеточного фага в инокуляте, и с лизисом псевдолизогенов за счет продолжения литического пути развития. После выращивания в жидкой среде из 13 клонов было проведено выделение плазмидной ДНК, оставшиеся два клон лизировались в жидкой среде и дали очень малое количество биомассы недостаточное для выделения.

**Трансдукция низкокопийных плазмид бактериофагом RB43 [7].** На втором этапе исследований, мы начали изучение трансдукции низкокопийных плазмид IncN-группы. Был проведен ряд экспериментов на способность бактериофагов  $\phi$ VZ7 и  $\phi$ VZ4 к трансдукции плазмид IncN-группы, на примере R15, N3, а также плазмиды RSF1010, представителя IncQ-группы несовместимости, широко используемой в качестве вектора для широкого круга бактерий-хозяев. В качестве контроля были выбраны псевдо-T-чётные бактериофаги RB43 и RB49.

Трансдукцию плазмиды N3 проводили из штамма *E. coli* C600(N3) в штамм *E. coli* CR204 и *E. coli* C600. Титр фага RB43, содержащий плазмиду, на штамме-реципиенте составил  $2,2 \times 10^8$  БОЕ/мл. При стандартных условиях трансдукции и множественности заражения – 0,1 трансдуктантов получено не было.

Трансдукцию плазмиды R15 проводили при модифицированных условиях эксперимента: увеличение концентрации реципиента в 10 раз. Трансдукцию плазмиды R15 проводили из штамма *E. coli* C600(R15) в штамм *E. coli* C600. На сегодняшний день нам удалось получить клоны, содержащие плазмиду R15, только с помощью фага RB43. Титр фага RB43, содержащий плазмиду, на штамме-реципиенте (*E. coli* C600) составил  $1 \times 10^9$  БОЕ/мл. При проведении трансдукции бактериофагом RB43 с множественностью заражения реципиента – 0,1 и 0,004, в ряде опытов было получено от 10 до 27 клонов, соответственно. Таким образом, частота трансдукции плазмиды R15 бактериофагом RB43 составила  $2,7 \times 10^{-5}$  (множественность 0,004) и  $4 \times 10^{-6}$  (множественность 0,1). При аналогичных условиях трансдукции другими бактериофагами клонов-трансдуктантов получено не было. Клоны были проанализированы на содер-

жание плазмиды R15.

Трансдукция плазмиды RSF1010 была осуществлена из штамма *E. coli* K802 в штамм *E. coli* CR204. Титр фага RB43, содержащий плазмиду, на штамме-реципиенте составил  $7 \times 10^7$  БОЕ/мл. При стандартных условиях трансдукции и множественности заражения – 0,1 было получено 18 клонов, таким образом, частота трансдукции составила  $7,2 \times 10^{-6}$ .

Таким образом, нами было впервые показано, что бактериофаги T4-типа способны к трансдукции природных низкокопийных плазмид, в том числе и такой большой – 62 тысячи пар нуклеотидов – плазмиды IncN-группы несовместимости как R15. Плазмида R15 [8] содержит в своем геноме ряд генов устойчивости к антибактериальным препаратам в составе транспозона, систему рестрикции и модификации гомологичную EcoRII и гены, ответственные за конъюгационный перенос плазмидной ДНК, которые эволюционно сходны с системой секреции IV типа и характерны для ряда патогенных бактерий. Все это говорит о возможном участии горизонтального переноса генов в эволюции энтеробактерий, посредством трансдукции бактериофагами T4-типа. Бактериофаги T4-типа – постоянные компоненты терапевтических препаратов. Наши опыты показывают возможность горизонтального переноса генов резистентности к антибиотикам и генов ответственных за патогенез с помощью трансдукции фагами этой группы от патогенных бактерий к представителям нормальной микрофлоры кишечника. Это говорит о необходимости осторожного подхода к их использованию в фаговой терапии.

#### *Библиографический список*

1. Wilson G.G. High-frequency generalised transduction by bacteriophage T4 / G.G.Wilson, K.K.Y.Young, G.J.Edlin, W.J.Konigsberg // *Nature*. - 1979. - V. 280. - No 5717. - p. 80-82.
2. Young K.K.Y. Genetic analysis of bacteriophage T4 transducing bacteriophages / K.K.Y.Young, G.J.Edlin, G.G.Wilson // *J.Virol*. - 1982. - V. 41. - No 1. - p. 345-347.
3. Young K.K.Y. Physical and genetical analysis of bacteriophage T4 generalized transduction / K.K.Y.Young, G.J.Edlin // *Molec.Gen.Genet*. - 1983. - V. 192. - p. 241-249.
4. Таяшин В.И. Трансдукция детерминант антибиотикорезистентности плазмиды pBR322 псевдо-T-четными бактериофагами / В.И.Таяшин, А.М. Боронин // Докл. РАН. - 1998. - Т. 363. - № 6. - С. 849-852.
5. Таяшин В.И. Котрансдукция плазмид системы рЕТ мутантами бактериофагов T4 и RB43 / В.И.Таяшин, А.А.Зимин, А.М.Боронин // *Микробиология*. - 2003. - Т. 72. - №6. - С.785-791.
6. Таяшин В.И. Трансдукция детерминант антибиотикорезистентности плазмид псевдо-T-четными бактериофагами / В.И.Таяшин, А.А.Зимин, М.Г.Шляпников, А.М. Боронин // *Генетика*. - 2003. - Т.39. - №7. - С. 914-926
7. Зимин А.А. Исследование трансдукции плазмид бактериофагами T4-типа: трансдукция в природных условиях, выделение новых трансдуцирующих бактериофагов, изучение трансдукции плазмид в отсутствие селекции антибиотиком и трансдукция низкокопийных плазмид / Зимин А.А., Васильева Е.Л., Васильева Е.А., Фишман К.С., Сузина Н.Е. // *Бюллетень Московского общества испытателей природы*. 2009. - отдел биологический. - том 114. - выпуск 3. - приложение 1. - часть 1. - С. 330-337.
8. Добрица А.П. Сравнительный анализ структуры плазмид N, P и W групп несовместимости / А.П.Добрица, Л.В.Дергунова, Т.Г.Михайлова, А.А. Зимин // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, - 1987. - №12, - С.3-10,

## THE PLASMID TRANSDUCTION BY T4-TYPE BACTERIOPHAGES (REVIEW)

*Zimin A.A.*

**Keywords:** *T4-type bacteriophages, horizontal transfer of genetic information, phage transduction*

*To study plasmid transduction by bacteriophage T4-type following experiments were conducted. We investigated transduction in nature - in the intestines of laboratory animal - mice. It was investigated the transduction of plasmids in the absence of antibiotic selection and studied transduction of low copy number plasmids.*

УДК 619:616.9

### О СПЕЦИФИЧНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ *HAFNIA ALVEI*

*Золотухин Д. С. \*, аспирант, тел. 8(8422)559547*

*Васильев Д. А. \*, доктор биологических наук, профессор, тел. 8(8422)559547*

*Золотухин С. Н. \*, доктор биологических наук, профессор  
тел. 8(927)2703480, [fym.zol@yandex.ru](mailto:fym.zol@yandex.ru)*

*Семенов А. М., доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, тел.  
(495) 939-27-76*

*Летаров А.В., кандидат биологических наук, зав. лабораторией вирусов  
микроорганизмов, тел.: (499) 135-21-39, Факс: (499) 135-65-30,*

*E-Mail: [inmi@inmi.host.ru](mailto:inmi@inmi.host.ru)*

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»*

*\*\*ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова»*

*\*\*\*ФГБУН «Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН»*

**Ключевые слова:** *бактериофаги, *Hafnia alvei*, гафниоз пчел, изоляты фагов, специфичность.*

*Определена специфичность бактериофагов *Hafnia alvei*, выделенных из сточных вод животноводческих ферм и мясокомбинат.*

#### **Актуальность исследования.**

Энтеробактерии рода *Hafnia* с единственным видом *Hafnia alvei* – грамотрицательные микроорганизмы не образующие спор и капсул, хемоорганотрофы, факультативные анаэробы. *Hafnia alvei* получила своё название от латинского существительного *alveus*, что означает улей. Имя рода *Hafnia* является историческим именем (*Havn*) для города Копенгагена, Дания.

Эти бактерии хорошо растут на простых питательных средах при 22—37°C, рН 7,2—7,4. На средах для энтеробактерий (Эндо, Левина) образуют бесцветные колонии S-типа, напоминающие колонии шигелл. На среде Плоскирева растут скудно, на висмут-сульфит-агаре не растут. Могут использовать цитрат и ацетат в качестве единственного источника углерода. Ферментируют глюкозу с образованием кислоты и газа; кислоты — маннит, арабинозу, рамнозу, трегалозу, ксилозу. Не ферментируют лактозу, инозит, дульцит, желатину, мочевины, не