

МЕТАСТАБИЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ, ФОРМИРУЕМЫЕ В СИСТЕМЕ ФАГ – ХОЗЯИН, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ФЕКАЛИЙ ЛОШАДИ

Летарова Мария Анатольевна*, младший научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов

Куликов Евгений Евгеньевич*, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов

Голомидова Анна Константиновна*, младший научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов

Прохоров Николай Сергеевич*, младший научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов

Кутузова Нина Михайловна**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Органическая и биологическая химия» биолого-химического факультета

Летаров Андрей Викторович*, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов

Стрелкова Дарья Михайловна***, студентка биологического факультета

Бакумова Анна Денисовна***, студентка биологического факультета

ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН»* 117312, г. Москва, Проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, +7(499) 135-21-39

ГБОУ ВПО «Московский педагогический государственный университет»**

г. Москва, ул. Малая Пироговская, д.1. стр.1. +7(499)245-03-10

ФГБОУ ВПО «МГУ им. М.В. Ломоносова»***

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, тел.: (495) 939-27-76

Ключевые слова: N4-подобный бактериофаг, подовирус, псевдолизогенные ассоциации, *Escherichia coli*.

Проведены исследования вирулентного N4-подобного колифага G7C, выделенного из образца фекалий лошади на культуре *E.coli* 4s, которая была получена из этого же образца. На основании полученных результатов исследований по изучению метастабильных, перевиваемых на плотных средах ассоциаций облигатно-вирулентного фага и его хозяина высказывается предположение, что подобные ассоциации могут играть важную роль в длительной персистенции фагов, сходных с G7C, в экосистеме кишечника лошади.

Введение

Бактериофаги являются неизменными компонентами большинства свободноживущих и симбиотических микробных сообществ [1], в том числе кишечных микробиомов человека и животных [2,3]. По имеющимся данным, фаговое сообщество кишечника представляет собой достаточно динамичную систему [4,5]. Однако структура фаговых сообществ в составе кишечной микрофлоры существенно различается у разных видов [2,3].

Особенностью кишечной экосистемы лошади является преобладание вирулентных бактериофагов, что относится также и

к популяциям фагов *E. coli*, которые обнаруживаются у некоторых животных в достаточно большом титре до 10^7 Б.О.Е. на грамм фекалий. По нашим данным [6,7], популяции колифагов у индивидуальных животных характеризуются выраженной динамикой, сопровождающейся колебаниями титров до 4 порядков (при использовании любой конкретной тест-культуры для мониторинга). При этом общий титр *E.coli* составляет около 10^6 К.О.Е./г. Внутривидовое разнообразие кокиформных бактерий чрезвычайно высоко: в кишечнике одной лошади может сохраняться до нескольких сотен различных штаммов *E.coli* и близких к ней видов [7,8].

Интересно, что спектр хозяев большинства кишечных колифагов, выделенных от лошадей, достаточно узок [4]. В частности, бактериофаг G7C, генетически родственный колифагу N4, способен инфицировать лишь один полевой изолят *E.coli* 4s и его дериваты. В настоящее время нам не удалось обнаружить других хозяев для этого фага. В то же время некоторые вирулентные бактериофаги могут длительное время сохраняться в кишечнике лошади, так, например, показана персистенция бактериофага Lc3 у лошади в течение трех лет, а фаги, родственные G7C, обнаруживаются у лошадей, содержащихся на одной и той же конюшне в течение 6 лет (Голомидова с соавт., личное сообщение). Таким образом, популяции индивидуальных колифагов в экосистеме кишечника лошади часто оказываются в ситуации, когда общая плотность доступных хозяев падает ниже критической [9,10], что должно было бы приводить к элиминации этих фагов. Тем не менее, популяции этих вирусов сохраняются в экосистеме кишечника длительное время. Одним из возможных объяснений данного феномена может быть образование ими так называемых псевдолизогенных ассоциаций (ПА) с хозяевами, которые могут существовать в виде локальных (микро)колоний. В таких ПА должны создаваться следующие условия:

1. Возможность роста чувствительных к фагу клеток, несмотря на значительную концентрацию свободных фаговых частиц в матриксе ассоциации.
2. Поддержание достаточно высокой плотности популяции *E. coli*, необходимой для поддержания фага в литическом цикле.
3. ПА должна быть стабильна в течение достаточно длительного времени и обладать способностью к пролиферации (то есть рассеву, с сохранением бактериального и вирусного компонентов).

В этой работе мы исследовали возможность формирования ПА и их свойства на модели системы бактериофаг G7C – *E. coli* 4s, которая была выделена из образца фекалий лошади и детально охарактеризована, включая определение полной последовательности генома фага [11].

Материалы и методы исследований.

Штаммы бактерий и бактериофагов и их культивирование.

В работе использовали штамм *E. coli* 4s и N4 - подобный бактериофаг G7C, которые были выделены нами в 2006 г из одного и того же образца фекалий лошади. Кроме того, использовали T5 - подобный фаг MPC600 (также выделенный нами от лошадей), который обладал способностью инфицировать дериваты *E. coli* 4s, резистентные к фагу G7C, но не исходный штамм. Для культивирования фага MPC600 использовали штамм *E.coli* C600. Бактерии выращивали на питательной среде LB следующего состава: триптон (Pronadisa) – 10 г, дрожжевой экстракт (Pronadisa), - 5 г, NaCl – 5 г, вода до 1 л. Агаризованная среда, LBsoft содержала 0,6% агар - агара, твердый LB – 1%.

Анализ состава ПА.

В некоторых случаях (см. результаты) определяли отношение фаг/клетки. Для этого приготавливали суспензию псевдолизогенной ассоциации (в физиологическом растворе). Соответствующие разведения использовали для посева на газон штамма-хозяина для подсчета фаговых бляшек и на плотные среды для получения отдельных колоний бактерий.

Для получения субклонов бактерий из ПА клетки отмывали от экзогенного фага с помощью инактивирующего свободные вирусные частицы экстракта чая [12]. Вирицидный экстракт готовили следующим образом: 10 г листьев чая заливали 100 мл кипящей стерильной воды, настаивали в сухожаровом шкафу при 100°C в плотно закрытом флаконе 30 мин., фильтровали через бумажный, а затем через мембранный фильтр, с порами 0,44 мкм, или автоклавировали. Экстракт хранили при +4°C.

Получение отдельных бляшек бактериофагов производилось методом посева двойным слоем на питательную среду. Получение газонов также производилось с помощью метода «двойного слоя», только без добавления бактериофага.

Пассирование ассоциаций осуществляли с помощью стерильных зубочисток или стерильных гематокритных капилляров,

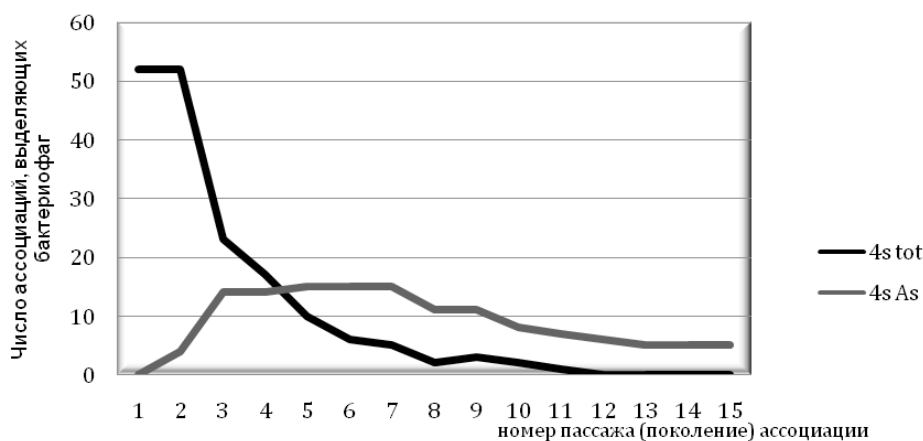


Рис. 1 – Зависимость количества ассоциаций, выделяющих фаг, от количества пассажей.

переноса материал с одной чашки Петри с агаром на другие, содержащие твердую среду или свежий газон бактерии-хозяина (для определения способности выделять фаг).

ПЦР ставили в объеме 20 мкл, на амплификаторе C1000 (BioRad). Для детекции фага использовали праймеры на ген 50 (g50D 5' GCCCATGCGTATTTCACAA и g50R 5' CCATAGCGTGTGTTACCGA).

Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Получение псевдолизогенных ассоциаций. Фаг G7C был рассеян до отдельных бляшек. Из некоторых случайно выбранных бляшек с помощью стерильной зубочистки на чашку с твердым агаром было перенесено содержимое бляшек. На чашке наблюдался рост бактерий.

Эти культуры переносили на чашки с газоном исходного штамма. Если в популяции наблюдался бактериофаг, то на газоне вокруг места посева образовывалась зона лизиса.

Для пассирования ассоциаций материал переносили на свежую чашку с плотной средой LB.

Результаты исследований. Всего было протестировано 53 ассоциаций (ПА) в 15 пассажах. В каждом пассаже учитывалось количество ПА, выделяющих фаг, детектируемый на газоне исходного штамма, а также на газоне штамма *E.coli* 4sAs (см. ниже).

Из 53 ПА к четвертому пассажу большинство прекратило выделять фаг, но 6 ПА

продолжали выделять фаг, детектируемый ПЦР, а также на штамме 4sAs вплоть до 11 пассажа (рис. 1).

Были проанализированы свойства субклонов бактерий из пяти ПА, которые сохраняли способность выделять фаг к 12 пассажу. Было обнаружено, что, несмотря на активное выделение фага на штамме 4sAs, субклоны ПА из пассажей с высокими номерами (6-7) оказались не чувствительны к исходному фагу.

В культуре штамма *E.coli* 4s всегда присутствуют клетки, устойчивые к фагу G7C с частотой около 10^{-4} (что значительно выше обычной частоты фагоустойчивых мутантов). Мы очистили резистентный штамм и обозначили его как 4sR. В отличие от штамма 4s, штамм 4sR оказался чувствителен к фагу MPC600.

Тестирование субклонов ПА обнаружило, что практически все они чувствительны к фагу MPC600. При этом многие из субклонов образуют зоны лизиса при посеве поверх своих собственных газонов (выделяют фаг), но при посеве на газон исходного штамма зон лизиса не обнаруживалось. При дальнейшем исследовании было установлено, что:

1. Все субклоны ПА чувствительны к фагу MPC600
2. Несмотря на вирицидную обработку суспензии перед посевом, некоторые субклоны содержат ассоциированный с ними фаг
3. Все субклоны способны расти на фоговом агаре с фагом G7C
4. В 7 пассаже появляются субклоны, на которых фаг G7C способен образовывать мелкие бляшки. В 8 пассаже такие субклоны преобладают, что, однако, не сопровождается увеличением титра фага, детектируемого на газоне штамма 4s.

Таким образом, при образовании и

развитии ПА изменяются и фаги, и клетки. Для дальнейшего исследования этого явления мы выбрали такой субклон, на котором растет фаг, содержащийся в ПА (далее – фаг phi 8810), но не растет исходный фаг G7C. Этот штамм мы назвали 4sAs. Данный штамм послужил тест-культурой для ретроспективного анализа выделения фага ПА с использованием замороженных до -70°C образцов (рис.1). Производные этого штамма, резистентные к фагу phi8810 (а равно и к исходному фагу G7C), были названы 4sAR. Мы исследовали эффективность посева (относительно штаммов, на которых получены соответствующие лизаты) фагов G7C и phi8810 и MPC600 на газонах штаммов E.coli 4s, 4sAs, 4sR и 4sAR. (табл. 1)

Анализ морфологии фагов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показал, что фаг phi8810 морфологически не отличим от исходного фага G7C. Это подтверждается также данными ПЦР и секвенирования полученных ПЦР-фрагментов. Таким образом, фаг phi 8810 не является контаминантом, но представляет собой дери- ват фага G7C с измененным спектром хозяев. Исследование профилей белков этих фагов с помощью ДСН-ПААГ электрофореза также не выявило между ними различий.

Морфология клеток различных дериватов E.coli 4s, полученных в этой работе, также не различалась (по данным световой микроскопии), однако исходный штамм 4s и штамм 4sAs обладали способностью формировать крупные агрегаты клеток, причем у 4sAs эти агрегаты иногда достигают размеров, различимых невооруженным взглядом. При этом все эти штаммы практически не образуют биопленок на поверхности пластика иммунологических плашек (данные не приведены).

Выводы. Таким образом, развитие ПА бактериофага G7C и штамма E. coli 4s – это процесс ко-эволюции фага и хозяина, приводящий к увеличению разнообразия как вирусных, так и бактериальных компонентов. При развитии ПА в некоторой части этих систем возникают такие сочетания фаг – бактерия, которые способны к длительному стабильному сосуществованию. Так, фаг

Таблица 1
Результаты литического действия бактериофагов на различные штаммы бактерий

Штаммы	ЭП, бактериофаги		
	G7C	Phi8810	MPC600
4s	1,0	10^{-5}	0
4sAS	10^{-6}	1,0	1,0
4sR	0	Л	1,0
4sAR	0	0	1,0
C600	0	0	1,0

Л – лизис бактерий неразведенным концентратом фагов, при отсутствии литического эффекта разведенного фаго-лизата

phi8810 способен расти на штамме 4sAs, но его литическая активность, по-видимому, ограничивается более медленной адсорбцией и способностью клеток штамма 4sAs к формированию плотных агрегатов, в которых часть клеток защищена от контакта с фагом. Возможность пролиферации ПА, выражающаяся в формировании субклонов, сохраняющих способность выделять фаг, также может быть объяснена агрегацией: при ресуспензировании ПА часть агрегатов, содержащих в том числе фаговые частицы, сохраняется и дает при рассеве начало колониям, содержащим как бактерии, так и фаг. Данный механизм может обуславливать длительную персистенцию бактериофага с узким хозяйским спектром в кишечном микробном сообществе даже в условиях очень низкой общей плотности доступных хозяев. Если ПА образуются *in situ*, достаточная для размножения фага плотность хозяев создается локально, в микроколониях. При этом пролиферация данных ПА по механизму, аналогичному описанному выше, может противостоять их механическому вымыванию из кишечника.

Библиографический список

1. Clokie, M.R. Phages in nature / M.R. Clokie, A.D. Millard, A.V. Letarov, S. Heaphy // Bacteriophage, 2011. 1:31-45
2. Letarov, A. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. A. Letarov, E. Kulikov // J. Appl. Microbiol. 2009. 107: 1-13.

3. Letarov, A. Bacteriophages as a part of the human microbiome. in Bacteriophages in Health and Disease (Hyman and Abedoneds) / A. Letarov / CAB International Press . 2012. pp. 6-20.
4. Minot, S. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet / S. Minot, R. Sinha, J. Chen, H. Li, S.A. Keilbaugh, G.D. Wu, J.D. Lewis, F.D. Bushman // Genome Res. 2011 21:1616-25
5. de Siqueira, R.S. Evaluation of the natural virucidal activity of teas for use in the phage amplification assay / de Siqueira R.S., C.E. Dodd , C.E. Rees // Int J Food Microbiol. 2006. 111:259-262.
6. Куликов, Е.Е. Биоразнообразие и динамика бактериофагов в фекалиях лошадей / А.С. Исаева А.С., Роткина, А.А. Маныкин, А.В. Летаров// Микробиология. 2007. 76, 271-278
7. Golomidova, A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions / A. Golomidova E. Kulikov, A. Isaeva, A. Manykin, A. Letarov // Appl Environ Microbiology. 2007. 73:5975–5981
8. Исаева, А.С. Новый метод высококорреляционного геномного ПЦР-фингерпринтинга энтеробактерий / А.С. Исаева, Е.Е. Куликов, К.К. Тарасян, Летаров А.В. // Actanaturae. 2010. 2 (1), 82-87
9. Kasman, L.M. Barriers to coliphage infection of commensal intestinal flora of laboratory mice / Kasman, L.M. // Virol J. 2005 Apr 15;2:34.
10. Kasman, L.M. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy / L.M. Kasman, A. Kasman, C. Westwater, J. Dolan, M.G. Schmidt, J.S. Norris // J Virol. 2002. 76:5557-5564
11. Kulikov, E.E. Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage vB_EcoP_G7C / Е.Е. Kulikov,., А.М. Kropinski, А.К. Golomidova // Virology. 2012. 426 (2012) 93–99
12. de Siqueira, R.S. Evaluation of the natural virucidal activity of teas for use in the phage amplification assay / de Siqueira R.S., ., C.E. Dodd , C.E. Rees // Int J Food Microbiol. 2006. 111:259-262.

УДК 631.472.56

ИССЛЕДОВАНИЕ СИМБИОНТНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДА *LUMBRICUS TERRESTRIS* (LINNAEUS, 1758) И ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИХ В КАЧЕСТВЕ ВЕРМИКУЛЬТУРЫ ДЛЯ БИОДЕСТРУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Романова Елена Михайловна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой «Биология, ветеринарная генетика, паразитология и экология»

e-mail: vvr-emr@yandex.ru

Игнаткин Денис Сергеевич, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Биология, ветеринарная генетика, паразитология и экология»

e-mail: ignatkin82@yandex.ru

Мухитова Минзифа Эминовна, кандидат биологических наук, ассистент кафедры «Биология, ветеринарная генетика, паразитология и экология»

Романов Василий Васильевич, кандидат технических наук, заведующий кафедрой «Информатика»

e-mail: vvr@ugsha.ru

Шленкина Татьяна Матвеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Биология, ветеринарная генетика, паразитология и экология»

e-mail: t-shlenkina@yandex.ru