

6. Michael M, Elliott EJ, Ridley GF, Hodson EM, Craig JC. Interventions for haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Cochrane Database Syst Rev. -2009.- CD003595.

7. Damien Maura, Eric Morello, Laurence du Merle, Perrine Bomme, Chantal Le Bougué-  
nec, Laurent Debarbieux. Intestinal colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* supports long-  
term bacteriophage replication in mice/ // Environment. Microbiol. -2011.– Vol.14.-P.1844-1854

8. Методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых  
*Escherichia coli*, продуцирующих шига-токсины (STEC-культуры), и обнаружению возбудите-  
лей STEC-инфекций в пищевых продуктах// МУК 4.2.2963-11// Москва, 2011

## **BACTERIOPHAGE ECD4: ISOLATION, CHARACTERIZATION AND ESTIMATION OF THE TREATMENT EFFECT AT EXPERIMENTAL *ESCHERICHIA COLI* O104:H4-INFECTION**

*Svetoch E.A., Verevkin V.V., Volozhantsev N.V., Borzilov A.I., Borzenkov V.N.,  
Korobova O.V., Kombarova T.I., Krasilnikova V.M., Myakinina V.P., Bannov V.A.,  
Denisenko E.A., Teimurazov M.G., Korovkin S.A., Dyatlov I.A.*

**Key words:** *Escherichia coli*, Shiga-toxin, bacteriophage, Balb/c mice, lytic activity

*Characteristics of bacteriophage ECD4 lytic for Shiga-toxin producing Escherichia coli O104:H4, some EHEC O157:H7 strains and other clinical E. coli strains; and some Shigella strains were determined. It was shown that the phage persists for some time into the body of non-infected mice Balb/c and decreases on 6-8 times the level of the pathogen into infected mice intestinal. The way for the increasing of the bacteriophages treatment effect at experimental E. coli O104:H4 infection is discussed.*

УДК 578.81

## **ОСОБЕННОСТИ ЭКОЛОГИИ ФАГОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАИНЫ**

*Семчук Л. И., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
Lidia\_Semchuk@univ.kiev.ua*

*Постоечко Е.М., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник*

*Ромашев С. А., старший инженер,*

*ОНЦ «Институт биологии» Киевский*

*национальный университет имени Тараса Шевченко, тел. +38-044- 521-35-02.*

**Ключевые слова:** Бактериофаги, экология, фитопатогенные бактерии, нуклеино-  
вые кислоты, рекомбинанты

*Изучали экологию фагов фитопатогенных бактерий четырнадцати штаммов родов  
*Xanthomonas*, *Erwinia* и *Pseudomonas*. Фаги, в отдельном биоценозе, удавалось обнаружить  
ко всем тестовым штаммам, при проведении ряда последовательных отборов проб. В то же*

время, в биологических образцах, отобранных на Украинской антарктической станции, обнаружены инфекционные фаги на тестовых бактериях. При этом, пробы, смытые с жабр рыб Черного моря, имели только литическую активность, без репродукции.

Показано, что резистентные к итаммам *X. axonopodis* pv. *beticola* IMV 7325, *P. syringae* pv. *atrofaciens* IMV 1025, *P. syringae* pv. *tabaci* IMV 223, *E. carotovora* IMV 216 (*Pectobacterium carotovorum*) фаги образовывали рекомбинанты, способные лизировать новых хозяев. Сравнение геномов моноспецифичных фагов *P. atrofaciens* IMV 1025, из полевой коллекции, с лабораторными рекомбинантами, показало, что профили разделения фрагментов ДНК *Hind*III всех образцов идентичны.

Указанные свойства фагов важно учитывать при их практическом применении, в частности, искусственном внесении в экосистему.

При построении экологических пирамид, у их основания размещают микроорганизмы и вирусы. Среди них вирусы бактерий, являются самыми многочисленными биологическими объектами на Земле [1], изучению роли которых не уделяется должного внимания. Данная работа представляет собой обобщение исследований, проведенных на протяжении продолжительного периода времени в лаборатории кафедры вирусологии Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Исследования были направлены на изучение особенностей экологии фагов активных против фитопатогенных бактерий, циркулирующих в агроценозах Украины.

В литературе нет данных об изменении числа бактерий на поверхности растений в биоценозах под влиянием фагов. Подобные данные приводятся для водных систем, где под влиянием фагов за сутки погибает до 20% бактерий, присутствующих в экосистеме [2]. Можно предположить, что в растительных биоценозах они также играют важную редуцирующую роль. Об этом свидетельствует широкое разнообразие фагов, выявляемых нами на поверхности растений. В исследованиях были использованы штаммы бактерий *Xanthomonas*, *Erwinia* и *Pseudomonas*: *P. syringae* pv. *aptata* IMV 185, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV 4013, *P. syringae* pv. *aptata* IMV 8545, *P. syringae* pv. *tabaci* IMV 8646, *P. viridiflava* IMV 8867, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV 4228, *P. syringae* pv. *tabaci* IMV 223, *X. axonopodis* pv. *beticola* IMV 7325, *P. syringae* pv. *lachrymans* IMV 7591, *P. syringae* pv. *atrofaciens* IMV 1025, *P. clororophis* IMV 8612, *P. alliicola* IMV 8494, *P. syringae* pv. *syringae* IMV 8653, *E. carotovora* IMV 216 (*Pectobacterium carotovorum*). Все тестовые культуры получены из музея фитопатогенных бактерий института микробиологии и вирусологии НАН Украины им Д. К. Заболотного. Обсуждаемые в данной работе фаги представляют собой полевые изоляты, полученные в нашей лаборатории.

Выделение полевых фагов из растительных биоценозов проводили, используя пробы, обладающие литической активностью к тестовым бактериям. Нам не удавалось выявить одновременно фаги, активные против всего списка используемых штаммов, при однократном заборе проб. Их обнаруживали ко всем используемым штаммам, при анализе проб, отбираемых с исследуемого участка, в динамике. Фаги смывали в 7 мл 0,1 М Трис- HCl буфера (высечка  $\approx 7 \text{ см}^2$ ) с поверхности листовой пластинки. В одном миллилитре их содержание варьировало от единиц до  $10^7$  БОЕ/мл [3]. Последнее указанное значение оценивали, как максимально возможную концентрацию фагов фитопатогенных бактерий на поверхности растений в природных ценозах. Это количество способно вызвать полный лизис бактериальной культуры на газоне чашки Петри (площадь  $\approx 70 \text{ см}^2$ ). Более высокие титры фагов получают в лабораторных условиях, при их репродукции на хозяине, растущем на концентрированных питательных средах.

Для фагов, присутствующих на поверхности почвы в растительных экосистемах, ареал отдельной популяции занимает площадь около  $2 \text{ см}^2$  [4]. Его размер на поверхности расте-

ний исследователями не определялся. Косвенные данные, полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют о том, что, очевидно, ареал фагов фитопатогенных бактерий имеет подобные значения. Об этом свидетельствуют те данные, что в отдельных пробах, отбираемых на общем участке, количество фагов распределялось не равномерно, а дискретно, локальными популяциями. Они были представлены либо максимально возможными концентрациями (при лизисе доминирующего штамма на поверхности растения), либо минимальными (отдельные сохранившиеся инфекционные частицы или спонтанная продукция лизогенных бактерий).

Одним из этапов нашей работы была задача поиска уникальных генотипов фагов, имеющих широкий спектр литической активности против фитопатогенных бактерий. Такие фаги могли иметь практическую и коммерческую ценность. Необходимы были фаги, с уникальными свойствами, являющимися потенциально перспективными для защиты от бактериозов растений, произрастающих на Украине.

Мы предполагали, что большинство фагов, выделенных из определенной растительной экосистемы и внесенные в неё же, могли просто «растворяться», не оказывая желаемого эффекта. Обнаружение фагов с искомыми характеристиками могло быть связано с другими экосистемами. География распространения фагов фитопатогенных бактерий не освещена, в связи с чем, мы обратились к анализу наличия вирусов бактерий на одной из наиболее удаленных от Украины точек - Украинской антарктической станции (Аргентинские острова, климат субантарктический, морской, средняя температура летом около нуля) [5]. Исследования носили поисковый характер. Информации о присутствии фагов фитопатогенных бактерий на Аргентинских островах мы не имели. Острова имеют бедную растительность. Предполагалось, что концентрация фитопатогенных бактерий не может быть высока и, соответственно, вероятность выявления искомым фагов крайне мала. Даже в случае их обнаружения, фаги должны были бы присутствовать в крайне низкой концентрации и иметь ярко выраженные психрофильные свойства. Как указывалось выше, в зоне умеренного климата, наибольшая вероятность выявления высоких концентраций фагов существует при оптимальных для размножения фитопатогенных бактерий условиях, +25°C. Такая зависимость не соблюдалась при анализе образцов растений и почвы, отобранных в экосистеме Антарктиды [6]. В результате, в водных экстрактах мхов и почвы, на газонах четырнадцати тестовых украинских штаммов, выявляли широкий спектр фагов. Их наличие констатировали в  $\approx 30\%$  проб. Среди всего пула обнаруженных фагов, в  $\approx 10\%$  случаев титры достигали значений  $10^6$  БОЕ/мл [6]. Около 40% фагов «Антарктиды» удалось вывести в стабильные линии, сохраняющие инфекционность при температуре +25°C. Такие значения сравнимы с данными, полученными для полевых фагов Украины [7].

Пул полученных фагов тестировали на наличие среди них генотипов с широким диапазоном хозяев. С этой целью, проводили их выращивание методом двухслойного агара, в чашке Петри, на газоне, представляющего собой смесь двух тестовых культур. На фоне мутных колоний искали прозрачные бляшки фагов, способные лизировать обоих хозяев. В результате, были выявлены прозрачные негативные колонии. Их последующее последовательное перенесение еще на два штамма позволило изолировать генотип, способный лизировать одновременно четыре штамма бактерий (*X. axonopodis* pv. *beticola* IMV 7325, *P. syringae* pv. *atrofaciens* IMV 1025, *E. carotovora* IMV 216 (*Pectobacterium carotovorum*), *P. syringae* pv. *tabaci* IMV 223). Таким образом, было установлено, что, поиск уникальных генотипов фагов в Антарктиде имеет свою перспективу.

До сих пор практически не изучался вопрос, о существовании границ распространения популяций фагов фитопатогенных бактерий. В частности, распространяется ли их география на прилегающие к наземным растительным биоценозам, морские акватории. В них фаги

могли быть смыты дождевыми потоками и в результате эволюции, адаптироваться.

Для поиска ответа проводили анализ присутствия фагов фитопатогенных бактерий в соприкасающейся с растительными биоценозами Украины, акватории Черного моря. Как известно, максимальные концентрации вирусов у морских животных выявляют на фильтрующей поверхности, жабрах. Смывы из них использовали для анализа наличия фагов фитопатогенных бактерий. Было установлено, что около 40% образцов вызывали лизис тестовых бактерий. Однако, все попытки вывести, путем пассажей такие фаги в стабильные инфекционные линии, не увенчались успехом. Фаги полностью инактивировались [8]. Очевидно, они являлись морскими фагами, способными вызывать лизис, за счет активности литических ферментов вирусов. Не исключено, что они могут выполнять важную роль, защищая жабры рыб от бактериальной инфекции. Полученные данные свидетельствуют в пользу того предположения, что в исследуемой акватории отсутствуют истинные фаги фитопатогенных бактерий.

В природе репродукция вирулентных фагов сопровождается полным лизисом хозяина. Образовавшаяся популяция фагов, при отсутствии чувствительного штамма постепенно уменьшается, а когда ее численность падает ниже критической, она инактивируется. В наших исследованиях (на моделях шести фагов фитопатогенных бактерий), было показано, что срок сохранения их биологической активности в биоценозе составляет около 14 дней [9]. Спектр литической активности у большинства полевых фагов узкий и способен инфицировать лишь несколько штаммов. Численность популяций может уменьшиться до критических значений и возникает угроза элиминации их из экосистемы. Однако, на практике, фаги широко распространены и стабильно присутствуют в биоценозах [10]. С поиском ответа на вопрос, каким образом обеспечивается постоянное присутствие узкоспецифических фагов в природе, мы столкнулись, при выделении фагов к штаммам: *P. alliicola* IMV 8494, *P. syringae* pv. *tabaci* IMV 8646, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV 4013, *P. syringae* pv. *aptata* IMV 8545.

Из полевых образцов нам не удавалось изолировать генетически стабильные линии искомым фагов. После пассажей они теряли инфекционность. Однако, мы исключали возможность того, что в природе какой-либо штамм не имеет своего природного ограничителя численности, коими являются фаги. Если мы не обнаруживали искомые фаги напрямую, то было решено получить их, как продукт рекомбинации. Для инфицирования использовали фаги, активные против других штаммов бактерий. На газонах, резистентных к используемым фагам, штаммов *P. alliicola* IMV 8494, *P. syringae* pv. *tabaci* IMV 8646, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* IMV 4013, *P. syringae* pv. *aptata* IMV 8545. Их инфицировали 24 вариантами пар вирусов. В результате были обнаружены рекомбинанты [11]. Это свидетельствовало о том, что подобные события, вероятно, происходят и в природе. Одновременно, возникал вопрос, можно ли в таком случае, рассматривать генотипы рекомбинантных фагов, как биологический объект с устойчивыми характеристиками.

Для ответа на поставленный вопрос проводили сравнение полевых и рекомбинантных фагов, активных против штамма *P. atrofaciens* IMV 1025. Использование этого штамма было обусловлено тем, что все, выделенные в нашей лаборатории, к нему фаги были моновалентны. У нас поддерживается большая коллекция изолятов фагов. Они выделены в разные годы и в разных географических точках Украины. Фаги *P. syringae* pv. *atrofaciens* IMV 1025 одного морфотипа, имели близкий белковый состав, а их геномы при рестрикционном анализе, при использовании фермента HindIII идентичны. У фагов других бактерий такой строгой закономерности не наблюдали.

Для образования рекомбинантных фагов к *P. atrofaciens* IMV 1025 отбирали полевые образцы, содержащие фаги, способные образовывать на тестовом штамме пятна лизиса, но не дающих инфекционное потомство. Пары таких изолятов, при смешанной инфекции, в трех

случаях из 48, образовывали стабильные рекомбинанты, 1025R1, 1025R2 и 1025R3. Сравнение геномов полевых штаммов и рекомбинантов проводили с помощью рестрикционного анализа, с применением эндонуклеазы рестрикции HindIII. Было установлено, что профили разделения фрагментов ДНК всех сравниваемых фагов, как хранящихся в коллекции, так и полученных после рекомбинации, идентичны. Их ДНК содержала значительное количество сайтов узнавания HindIII, что позволяет говорить о подобии их ДНК. Полученные результаты указывают на важную роль хозяев в процессе естественной эволюции фагов, нуждающуюся в дальнейшем изучении.

Таким образом, учет многофакторных взаимоотношений фагов и их хозяев, исследование экологии, разработка принципов селекции фагов, которые не сформулированы и устанавливаются в каждой лаборатории индивидуально, является необходимым условием для создания научно обоснованных подходов к решению важной задачи разработки экологически безопасных препаратов защиты растений, на основе вирусов бактерий.

### **Библиографический список**

1. Wommack K.E & Colwell R.R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol //Mol. Biol.* - 2000. - 64, № 1, - P. 69-114
2. Suttle A. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities // *Microbial. Ecology* . - [1994](#), № 2, - P. 237-243
3. Семчук Л.І., Андрійчук О.М., Ромашев С.А., Ігнатенко Т.А., Яцковська Л.І. Екологічні аспекти циркуляції фагів фітопатогенних бактерій у біоценозах // *Екологічний вісник*. - 2003. - Київ, - С. 498 – 504
4. Vos M. , Birkett P., Birch E., Griffiths R., Buckling. A. Local Adaptation of Bacteriophages to Their Bacterial Hosts in Soil // *Science*. - 2009. - 325. - P. 833
5. Попов Ю.И., Скрыпник В.В., Тимофеев В.Е., Украинский В.В. Гидрофизические аномалии и их связь с метеорологическим режимом в районе Антарктической станции Академик Вернадский в течении летних сезонов 2000-2001 гг. // *Украинский антарктический журнал*. - 2003, №1, - С. 79-84
6. Бойко А.Л., Семчук Л.І., Войціцький В.М., Андрійчук О.М. Ромашев С.А., Ігнатенко Т.А., Яцковська Л.І., Ващенко В.М., Делімаат А. Виявлення фагів фітопатогенних бактерій в Антарктиді // *Агроєкологічний журнал*. - 2003, №4, - С.12-15
7. Андрійчук О.М., Семчук Л.І., Ромашев С.А., Ігнатенко Т.А., Яцковська Л.І., Бойко А.Л. Динаміка виділення фагів фітопатогенних бактерій із листя та коренів цукрових буряків. // *Вісник КНУ. - Сер. Біол.* - 2004. №42, - С. 49-51
8. Семчук Л.І., Степанова О.А., Бойко А.Л., Андрійчук О.М. Виявлення фагів фітопатогенних бактерій у зябрах риб Чорного моря // *Вісник КНУ. Сер. Біол.* - 2003. №41, - С.156-158
9. Ромашев С.А., Семчук Л.І., Андрійчук О.М., Ігнатенко Т.О., Яцковська Л.І., Колонюк І.О. Дослідження фагів фітопатогенних бактерій та їхнього впливу при внесенні на експериментальні ділянки з посівами цукрового буряку // *Вісник КНУ. Сер. Біол.* - 2005. №44, - С. 33-34
10. Weinbauer M. Ecology of procaryotic viruses. // *FEMS Microbiology Reviews*. -2004. - 28, P.127-181
11. Семчук Л.І., Ромашев С.А., Ігнатенко Т.О. Аналіз частоти рекомбінацій фагів фітопатогенних бактерій та їхня роль у природі. // *Вісник КНУ Сер. Біол.* - 2006. №47, - С.36-38

## **PARTICULAR QUALITIES ECOLOGY PHAGES OF PHYTOPATHOGENIC**

**BACTERIA, CIRCULATING IN AGROCENOSSES OF UKRAINE***Semchuk L.I., Postoenko E.M., Romashev S.A.*

**Keywords:** *Bacteriophages, ecology, phytopathogenic bacteria, nucleic acids, Recombinant.*

*Studied ecology of phages, to fourteen strains phytopathogenic bacteria Xanthomonas, Erwinia and Pseudomonas. Phages in a separate ecological community, could be detected for all test strains during several consecutive sampling. At the same time, in biological samples taken at the Ukrainian Antarctic station, has been detected phages infections on test bacteria. In analysis samples, washed from the gills fishes Black Sea, was observed only lytic activity, no reproduction.*

*It shown, that resistance, to strains of X. axonopodis pv. beticola IMV 7325, P. syringae pv. atrofaciens IMV 1025, P. syringae pv. tabaci IMV 223, E. carotovora IMV 216 (Pectobacterium carotovorum) phages, formed recombinants, which are capable to lysing new hosts.*

*A comparison genomes of monospecific phage P. atrofaciens IMV 1025, from collection, with laboratory recombinants, showed that the profiles DNA HindIII -fragments all samples are identical. Studying the properties of phages is important to consider at their practical implementation, in particular, the artificial bring in ecosystem.*

УДК 579.262

**ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ БАКТЕРИОФАГОВ  
E. COLI КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА СВИНЕЙ**

*Скобляков Н.Э., кандидат медицинских наук  
ГНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт  
животноводства Россельхозакадемии (СКНИИЖ)  
тел. 8(918)4989891, [skoblikow@yandex.ru](mailto:skoblikow@yandex.ru)*

*Зимин А.А., кандидат биологических наук  
ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина  
РАН (ИБФМ РАН)  
8(4967)730479, [zimin@ibpm.pushchino.ru](mailto:zimin@ibpm.pushchino.ru)*

**Ключевые слова:** *бактериофаги, E.coli, свиньи, возрастная динамика*

*Работа посвящена определению титра и разнообразия бактериофагов E.coli в кишечнике поросят первых месяцев жизни. Установлено: пик количества и разнообразия коли-фагов приходится на 27 день; динамика имеет тенденцию к снижению с титра 4,73 – 5,46 lg БОЕ/г до неопределяемых значений к 66 дню; большую часть (89,7%) коли-фагов составляют фаги T4-типа семейства Myoviridae.*

**Введение**

В настоящее время исследованиям микробной экологии растущих животных посвящено уже значительное количество работ [1], однако в абсолютном большинстве они касаются рассмотрения бактериальной составляющей, в то время как рассмотрение бактериофагов, составляющих единую микроэкологическую систему с изучаемыми бактериями-хозяевами,