

УДК 578.4 57.018.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЧАСТОТУ ТРАНСДУКЦИИ ПЛАЗМИД БАКТЕРИОФАГОМ RB49

© 2024 г. А.Н. Никулина*, #, Н.А. Никулин*, А.А. Зимин*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
просп. Науки, 5, Пушкино Московской области, 142290, Россия

*E-mail: a.karmanova@ibpm.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 16.02.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Т4-родственный бактериофаг RB49, способен осуществлять общую трансдукцию плазмид с относительно высокой частотой. За счет этого механизма бактерии могут приобретать возможности для адаптации к изменяющимся условиям среды и осваивать новые экологические ниши. Исследовано воздействие pH, температуры и облучения длинноволновым ультрафиолетовым светом ($\lambda = 366$ нм) на характеристики препарата фага RB49, содержащего трансдуцирующие частицы с плазмидной ДНК pTurboGFP-B и вирулентные частицы с собственной ДНК. Получены данные об изменениях титра вирулентных частиц и частоты трансдукции плазмиды pTurboGFP-B фагом RB49. После воздействия УФ-излучения в течение 2 ч частота трансдукции плазмиды pTurboGFP-B фагом RB49 выросла в ~3 раза. За 40 мин хранения препарата во льду также отмечался рост частоты трансдукции в несколько раз. На основе полученных экспериментальных данных можно сделать предположение, что трансдуцирующие частицы фага RB49 могут быть более устойчивы к действию длинноволнового УФ-излучения и воздействию температур, близких к 0°C, чем вирулентные, и обеспечивать процесс трансдукции более эффективно, чем при нормальных условиях. Схожие процессы могут происходить и в хорошо освещенных водоемах, в том числе холодных, в которых могут встречаться фаги, родственные RB49. Это может свидетельствовать о возможности более интенсивного горизонтального переноса генов в водных экотопах, чем предполагалось ранее.

Ключевые слова: бактериофаг RB49, трансдукция плазмид, УФ, горизонтальный перенос генов.

DOI: 10.31857/S0006302924030117, EDN: OFBSFW

Бактериофаги — вирусы бактерий — способны эффективно осуществлять горизонтальный перенос генов между своими хозяевами посредством трансдукции. Было показано, что фагоподобные элементы найдены во многих бактериальных геномах и размер таких элементов может составлять до 20% от генетического материала клетки [1, 2].

Например, было установлено, что многие штаммы бактерий приобрели факторы вирулентности и/или патогенности за счет взаимодействия с фагом. К примеру, *E. coli* O157:H7 получила гены шиги-токсинов (*stx1* и *stx2*) за счет интеграции в хромосому профагов — 933V и 933W [3, 4].

Фаги ответственны и за приобретение бактериями устойчивости к антибиотикам. Передача

фагами устойчивости к тетрациклинам, хлорамфениколу, пенициллинам была продемонстрирована у большого числа бактерий: *Salmonella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* [5]. Было показано, что фаги ф80α и фJB способны эффективно переносить плазмиды с генами устойчивости к пенициллину и тетрациклину между штаммами *Staphylococcus aureus* с частотой 10^{-6} – 10^{-5} [6, 7].

На сегодняшний день выделяют три механизма фаговой трансдукции [8]. Первый — специализированная трансдукция, осуществляемая фагами с лизогенным циклом развития. Механизм тесно связан с жизненным циклом фага, в результате неправильного вырезания интегрированного профага из специальных сайтов в ДНК может происходить захват соседних участков бактериального генома с последующей их упаковкой в капсид фага. В результате этого образуются тран-

Сокращение: УФ — ультрафиолетовый.

сдуцирующие частицы, содержащие как фаговую, так и бактериальную ДНК. Специализированная трансдукция ограничивается передачей определенных генов, окружающих место интеграции генома на бактериальной хромосоме. Наследование донорской ДНК в результате специализированной трансдукции может происходить за счет сайт-специфической рекомбинации, опосредованной интегразой фага или же за счет гомологичной рекомбинации. Примером фага, осуществляющим специализированную трансдукцию, является бактериофаг λ .

Второй механизм — генерализованная (общая) трансдукция. Природа данного явления связана с работой терминазы фага — белка, ответственного за узнавание и упаковку генетического материала в собирающуюся вирусную частицу [8]. Отмечается, что генерализованная трансдукция в основном опосредуется фагами рас-типа, упаковывающими ДНК в капсид по механизму «полного заполнения головки» (headfull package). Если на бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной) присутствуют сайты, гомологичные фаговым сайтам узнавания терминазы — псевдо-рас-сайты, то она может быть ошибочно распознана как вирусная и упакована в капсид [8, 9]. Предполагается, что таким образом может быть упакована любая часть генома бактерии и передана от одной клетки к другой. Получающаяся в ходе данного процесса частица является трансдуцирующей (в то время как частица, содержащая фаговую ДНК — вирулентной). Она сохраняет способность к абсорбции на клеточной стенке хозяина и внесение ДНК в его цитоплазму. Попавшая в клетку ДНК может либо интегрироваться в хромосому хозяина за счет процессов рекомбинации, либо же остаться в цитоплазме в случае, если была перенесена плазмидная ДНК [9]. Данный тип трансдукции был хорошо описан для фага *Salmonella sp.* — P22 и фага P1, хозяином которой выступает *E. coli*. Стоит отметить, что генерализованную трансдукцию, в отличие от специализированной и латеральной, могут также осуществлять бактериофаги с литическим циклом развития,

Третий механизм, выделенный относительно недавно — это латеральная трансдукция. Такой тип трансдукции, по всей видимости, более характерен для фагов с лизогенным жизненным циклом. Латеральная трансдукция инициируется на ранних стадиях активации профага — в момент, когда фаг еще интегрирован в хромосому бактерии. Начинается процесс репликации, в результате чего создаются копии фаговой ДНК и окружающей его ДНК хозяина. Часть профагов вырезается из хромосомы и образуют вирулентные частицы, а часть остается интегрированной и содержит при этом большое количество рас-сайтов. Впоследствии они распознаются терминазой

фага, которая будет расщеплять и транслоцировать ДНК в доступные фаговые капсиды, при этом капсид будет содержать смесь фаговой и хромосомной ДНК [10, 11]. Впервые механизм латеральной трансдукции был показан для бактериофагов *Staphylococcus aureus* [8]. Согласно последним исследованиям, бактериофаг P22 может использовать механизм латеральной трансдукции [12]. Отмечается, что латеральная трансдукция, в отличие от двух остальных, имеет скорее направленный характер, т.е. процесс заложен в жизненном цикле фага, а не случаен.

Таким образом, благодаря трансдукции бактерии могут приобретать возможность выживать в неблагоприятных условиях и занимать новые экологические ниши. На данный момент достаточно мало сведений о том, как могут влиять факторы среды на трансдуцирующие частицы и как долго вследствие воздействия этих факторов они могут сохраняться в среде. Данные об устойчивости трансдуцирующих частиц к внешним факторам среды в дальнейшем помогут лучше оценить вклад горизонтального переноса генов, обеспечиваемого бактериофагами, в эволюционные процессы у бактериальных популяций.

Было показано, что ряд T4-родственных бактериофагов, а именно RB42, RB49 и RB43 могут переносить плазмиды между штаммами бактерий достаточно эффективно — частота трансдукции варьировала в зависимости от фага и плазмиды от 10^{-2} до 10^{-6} [13, 14]. Бактериофаги RB43, RB49 и RB42 имеют литический цикл развития и относятся к тому же семейству *Straboviridae* [15], что и T4, не отличаются по морфологии и способу упаковки ДНК, но имеют существенную разницу в геномных последовательностях по сравнению с ним [16]. RB43, RB49 и RB42 имеют большие удлиненные икосаэдрические головки, сокращающийся хвост и фибриллы, размер капсида частиц в пределах 90 нм в ширину и 120 нм в длину [17–19]. Упаковка ДНК в капсид у T4-родственных бактериофагов происходит после сборки капсидов по механизму «полного заполнения головки» и осуществляется за счет комплекса белков, формируемого тремя компонентами: малой терминазой TerS, большой терминазой TerL и портовым белком. TerS распознает вновь реплицированную сильно разветвленную ДНК вирусного генома, представленного конкатемером «голова–хвост». На сегодняшний день не были точно определены последовательности рас-сайтов, распознаваемых TerS, как, например, для классических фагов с упаковкой по рас-типу — SPP1 и P22, т.е. сайт начала упаковки выбирается практически случайно [19]. Специфичность узнавания терминазой собственного генома для исключения генома хозяина из упаковки, по всей видимости, не так важна для некоторых предста-

вителей T4-родственных фагов, в частности, для тех, у кого в составе ДНК встречаются неканонические основания [19]. T4 и большинство родственных ему фагов имеют эндонуклеазы, которые разрушают хозяйскую ДНК с каноническими основаниями и остальные белки, косвенно или прямо участвующие в снижении возможности взаимодействия вируса с ДНК бактерии-хозяина, тем самым обеспечивая заполнение капсида оставшейся в клетке собственной ДНК с различными модификациями. Механизм работает эффективно — T4 дикого типа не способен к горизонтальному переносу генов за счет трансдукции, либо она идет с очень низкой частотой. Экспериментально было показано, что мутанты T4 по генам вышеописанных белков, метаболизма неканонических оснований, с замененным 5'-гидроксиметилцитозином на цитозин способны к общей трансдукции ДНК хозяина (в том числе плазмидной) с высокой частотой. Размер ДНК трансдуцирующих частиц цитозиновых мутантов T4 совпадал с размером ДНК вирулентной частицы и состоял из конкатемера множества копий трансдуцируемой плазмиды [20]. Количество копий плазмиды зависит от ее размера, например, трансдуцирующий мутант T4 будет содержать около 38 эквивалентных мономеров pBR322 [20]. Трансдуцирующие частицы также могут содержать только хромосомную ДНК хозяина — имеются данные о частоте трансдукции мутантом фага T4 генов *E. coli*, ответственных за метаболизм сахаров и аминокислот [21]. Для трансдуцирующих частиц мутантных T4 было показано, что они могут нести гибридную ДНК из фаговой и плазмидной, однако такие частицы формируются только в случае, если плазида несет в себе последовательности из фагового генома [22]. Такие частицы могут образовываться за счет механизма репликации, зависимой от рекомбинации, присущей T4-родственным бактериофагам [22]. Механизм упаковки ДНК T4-родственных фагов не предполагает разницы в морфологии капсида у вирулентных и трансдуцирующих частиц, также не ожидается разницы и в плотности упакованной ДНК. На сегодняшний день до конца неизвестны молекулярные механизмы трансдукции, осуществляемой фагами RB43, RB49 и RB42, однако предполагается, что она осуществляется по типу общей трансдукции и схожа по молекулярному механизму с таковой для цитозиновых мутантов T4. Предположительно, возможность к формированию трансдуцирующих частиц фагами RB43, RB49 и RB42 связана с отсутствием у них неканонических оснований в составе ДНК и генов, ответственных за их метаболизм. Трансдукция хромосомных генетических детерминант для этих фагов до сих пор не показана.

Нами было замечено, что трансдуцирующие частицы бактериофагов RB42, RB43 и RB49, не-

сущие плазмиды, по всей видимости, могут лучше по сравнению с вирулентными частицами сохраняться при долгосрочном хранении при 5–7°C (неопубликованные данные) и при краткосрочном хранении при 37°C [14]. В опытах с препаратами фагов при указанных температурах мы наблюдали увеличение частоты трансдукции, что и дало основания для данных предположений.

Основные экологические ниши бактериофагов RB42, RB43 и RB49 — это микроорганизмы, обитающие в желудочно-кишечном тракте животных, сточных водах и фекалиях. В данной работе мы провели исследование влияния тех факторов, с которыми бактериофаги RB42, RB49 и RB43 могут сталкиваться в природных условиях, а именно низкая величина pH среды, соответствующая желудочному соку, и длинноволновое ультрафиолетовое (УФ) излучение ($\lambda = 366$ нм), которое входит в состав солнечного спектра и способно достигать поверхности Земли, минуя озоновый слой. Помимо этого, мы проверили и влияние щелочной среды и температур, используемых при пастеризации. Для трансдукции была выбрана плазида pTurboGFP-B, несущая в себе гены устойчивости к двум антибиотикам и ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP-B. Плазида не имеет последовательностей, гомологичных геному фагов RB49, RB42 и RB42, и переносится с частотой порядка 10^{-5} – 10^{-6} при нормальных условиях трансдукции данными фагами *in vitro*. Отсутствие или наличие экспрессии зеленого флуоресцентного белка у клеток-трансдуктанов является хорошим маркером изменений в последовательности плазмидной ДНК, переносимой бактериофагом, что позволяет быстро определять интересующие трансдуктанты для дальнейшего анализа. Основным хозяином для фагов RB49, RB42 и RB42 является *E. coli*. Для трансдукции и развития фагов более удобными для проведения экспериментов являются штаммы с отсутствием систем защиты от чужеродной ДНК, например штаммы без систем рестрикции модификации, поэтому для данной работы был выбран штамм *E. coli* 5K.

Таким образом, целью данной работы стало изучение влияния температуры, pH и длинноволнового ультрафиолетового излучения на характеристики препарата фага RB49, содержащего вирулентные частицы с собственной ДНК и трансдуцирующие частицы с конкатемером из ДНК плазмиды pTurboGFP-B.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, плазмиды и бактериофаги, используемые в работе. В работе был использован лабораторный штамм *E. coli* 5K ($F^- r^- k^- m^- k^-$, *rpsL thr thi leu lacZ*), трансформированный

плазмидой pTurboGFP-B (ЗАО «Евроген», Москва, Россия), в качестве донора плазмидной ДНК для получения трансдуцирующих частиц бактериофага RB49. Плазида pTurboGFP-B несет в себе гены устойчивости к ампициллину, хлорамфениколу и ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP-B (*ampR*⁺, *cmR*⁺, *turboGFP* соответственно), является многокопийной. В качестве штамма-реципиента был использован этот же штамм *E. coli* 5K, но без плазмиды.

Трансформация плазмид в бактериальные штаммы. Культуру-реципиент *E. coli* 5K выращивали в течение ночи при 37°C в среде LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl) с добавлением 50 мкг/мл стрептомицина. Приготовление компетентных клеток и трансформацию *E. coli* 5K проводили, как описано в монографии «Молекулярное клонирование» [23]. После трансформации проводили высев на чашку со средой Агар МакКонки-ГРМ (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, пос. Оболенск, Московская обл., Россия) с селективными антибиотиками (100 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл левомицетина и 50 мкг/мл стрептомицина). Инкубировали при 37°C в течение ночи. Полученные единичные колонии пересевали несколько раз.

Получение чистого препарата бактериофага RB49. Бактериофаг RB49, полученный из коллекции А.А. Зимина (ФИЦ ПНЦБИ РАН – Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Московская область, Россия), был микробиологически очищен путем трехкратных пересевов из единичных бляшек с использованием метода агаровых слоев. В качестве хозяина для фага был использован лабораторный штамм *E. coli* 5K. Далее было проведено выращивание бактериофага в объеме 50 мл и его очистка методом изопикнического центрифугирования [24]. Очистку от бактериальных клеток и их обломков проводили центрифугированием в течение 20 мин при 5000 g, осаждение фаговых частиц – при 10000 g в течение 45 мин в присутствии 10% ПЭГ 6000. Осадок фаговых частиц ресуспендировали в фаговом буфере (200 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0). До очистки от клеточных обломков, добавления ПЭГ и после ресуспендирования фаговых частиц добавляли ДНКазу (20 мкг/мл). Для хранения добавляли хлороформ, ДНКазу до 20 мкг/мл и помещали в холодильник на 7°C.

Получение препарата фага RB49, содержащего трансдуцирующие частицы с плазмидой pTurboGFP-B. Ночную культуру-донор *E. coli* 5K, содержащую плазмиду pTurboGFP-B, добавляли к 50 мл среды LB с добавлением селективных антибиотиков (100 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл левомицетина, 50 мкг/мл стрептомицина) и вы-

ращивали при перемешивании в колбе при 37°C до достижения оптической плотности $OD_{590} = 0.5$. Добавляли очищенный бактериофаг RB49 до множественности (отношения количества частиц фага на клетку, т.е. *БОЕ/КОЕ*) 0.1. Совместное культивирование фага и бактерии-донора плазмиды проводили в течение 2 ч при 37°C, после чего проводили лизис выживших бактерий за счет добавления хлороформа (1/10 от объема культуры). Клеточные обломки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 5000 g, фильтровали через фильтр с порами диаметром 220 нм, чтобы полностью очистить препарат от клеток. К полученному препарату добавляли ДНКазу до 20 мкг/мл и хранили с добавлением хлороформа.

Для чистоты описанных ниже экспериментов за сутки препарат разбавляли в 10 раз в 0.9% NaCl с добавлением ДНКазы (далее в методах полученный разбавленный препарат упоминается как «препарат фага»). В день проведения опыта у разбавленного препарата определяли частоту трансдукции и титр вирулентных частиц до воздействия на него исследуемого фактора.

Измерение титра бактериофагов. Измерение титра бактериофагов производили по методу агаровых слоев [24]. Из следующих разведений бактериофага: 1:100, 1:10000, 1:1000000, 1:100000000 по отдельности были отобраны по 100 мкл суспензии и добавлены к полужидкой среде LB (концентрация агара 0.6%), содержащей ночную культуру *E. coli* 5K. Полученную смесь наносили на чашки Петри с плотной средой LB. Культивировали в течение суток при 37°C и подсчитывали количество бляшек на каждой чашке и определяли концентрацию фага.

Эксперимент по влиянию pH. Препарат фага распределяли по 1000 мкл в три стеклянные пробирки. В первую пробирку добавляли 5% HCl до конечной концентрации 0.5%, pH 2.0. Во вторую пробирку добавляли 0.2 н NaOH до достижения pH 9.0. Пробу в третьей пробирке оставляли без воздействия кислоты и щелочи (pH 7.0). Все три пробирки оставляли при 37°C на 40 мин. Спустя 30 мин производили реакцию нейтрализации – в случае с HCl добавляли NaOH до достижения нейтрального pH (pH 7.0) и наоборот. Далее проводили определение числа вирулентных частиц и частоты трансдукции для каждого опытного образца.

Эксперимент по влиянию ультрафиолетового излучения. Препарат фага распределяли по 1.5 мл в 8 пластиковых чашек Петри. Четыре чашки Петри подвергали воздействию УФ-излучения ($\lambda = 366$ нм) в течение 30, 60, 90 и 120 мин, еще 4 чашки оставались в течение тех же временных промежутков в качестве контрольных в полной темноте (т.е. по 1 чашке опытной и 1 контрольной

на временную точку, после воздействия пробу уносили на анализ). В эксперименте была применена система Desaga UVIS (DESAGA, Голландия), в качестве источника УФ-излучения была использована ртутная газоразрядная лампа низкого давления с трубчатой стеклянной колбой мощностью 6 Вт. Длина волны составляла 366 нм. Видимый свет лампы блокировали специальными УФ-фильтрами, предусмотренными конструкцией системы Desaga UVIS. Источник УФ-излучения находился на расстоянии 10 см от образцов. Облученность образцов составляла 1.2 мВт/см^2 . В ходе анализа проводили титрование фага из препарата и трансдукцию. Опыт проводили при комнатной температуре (25°C), значимого изменения температуры в растворе, имитирующем образец, за 2 ч УФ-облучения отмечено не было.

Эксперимент по влиянию температур. Препарат фага распределяли по 1 мл в три пробирки типа Эппендорф. Одну пробирку препарата фага с трансдуцирующими частицами помещали на водяную баню при температуре 65°C , вторую пробирку оставляли при комнатной температуре (25°C), третью помещали в лед. Инкубация происходила в течение 40 мин, затем проводили трансдукцию и титрование фагов из опытных препаратов.

Получение колоний трансдуктантов. 100 мкл препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой rTurboGFP-B (контрольного или подвергнутого воздействию выбранных факторов), смешивали с 100 мкл ночной культуры-реципиента *E. coli* 5K (без плазмиды), инкубировали при комнатной температуре (25°C) в течение 20 мин. Всю полученную смесь наносили на чашку со средой Агар МакКонки-ГРМ с селективными антибиотиками (100 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл левомицетина и 50 мкг/мл стрептомицина). Инкубировали при 37°C в течение ночи. Полученные единичные колонии-трансдуктанты пересеивали несколько раз для очистки от фага и дальнейшего анализа плазмиды. Для дополнительного контроля и исключения ложноположительных результатов во время каждого проводимого опыта аналогичным образом проводили проверку препарата фага и препарата культуры-реципиента на наличие в них живых и устойчивых к вышеуказанному ряду антибиотиков клеток *E. coli*. Согласно результатам дополнительных контрольных исследований, антибиотикорезистентные бактерии в препаратах фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой rTurboGFP-B и в культуре-реципиенте *E. coli* 5K, до опыта обнаружены не были. Оценку наличия либо отсутствия экспрессии GFP-B у получаемых трансдуктантов проводили путем визуальной проверки

флуоресценции колоний при облучении их синим светом с длиной волны $\lambda \sim 455 \text{ нм}$.

Расчет частоты трансдукции. В каждом эксперименте частоту трансдукции рассчитывали делением количества трансдуктантных колоний на количество жизнеспособных фаговых частиц. Таким образом, частота трансдукции высчитывалась по формуле [9, 13]:

$$A = C/F,$$

где A — частота трансдукции; C — количество колоний-трансдуктантов, КОЕ в смеси; F — число частиц фага в смеси, БОЕ.

Выделение плазмидной ДНК из трансдуктантов, ее рестрикционный анализ. Плазмиды выделяли методом щелочного лизиса, как описано в монографии [23], из ночной культуры трансдуктантов, выращенной в 5 мл LB с 100 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл левомицетина, 30 мкг/мл стрептомицина при 37°C . Полученные плазмиды из трансдуктантов разделяли в 1% агарозном геле на основе $1\times\text{TBE}$ (Tris — 0.1 М, борная кислота — 0.1 М, ЭДТА — 2 мМ, pH 8.0), гель окрашивали бромистым этидием, продукты разделения визуализировали с помощью трансиллюминатора.

Для проведения рестрикционного анализа в пробирку добавляли до 1 мкг плазмидной ДНК трансдуктантов, эндонуклеазы рестрикции PvuII (ООО «СибЭнзайм», Новосибирск, Россия) до 10 единиц активности фермента, до $1\times$ буфера Green (ООО «СибЭнзайм», Новосибирск, Россия), 100 мкг/мл буфера BSA, доводили смесь до 20 мкл деионизованной водой. Пробирки инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Результаты проверяли при помощи электрофореза, методика описана выше.

Статистический анализ. Каждый эксперимент по влиянию физико-химического фактора на препарат фага был проведен дважды. Определение титра фага и частоты трансдукции для каждого образца производили не менее 5 раз. Статистически значимых отличий между результатами двух одинаковых опытов по результатам теста с использованием парного t -критерия Стьюдента найдено не было ($p\text{-value} < 0.05$), в работе представлены данные одного из двух проведенных опытов.

Для вычисления среднего значения, стандартного отклонения и стандартной ошибки в измерениях титра бактериофагов и частоты трансдукции использовали функции MS Excel. В работе представлены вычисления титра фага и частоты трансдукции в формате $\bar{X} \pm \text{SD}$ (среднее значение показателя $\pm$ стандартное отклонение). Вычисления нормальности распределения полученных выборок использовали тест Шапиро–Уилка, расчет W -критерия и $p\text{-value}$ проводили с исполь-

зованием пакета программных средств R. Для нахождения статистически значимых отличий между показателями титра фага и частоты трансдукции у препаратов, подвергающимся воздействию физико-химических факторов и контрольных препаратов рассчитывали парный *t*-критерий Стьюдента (в некоторых случаях проводили тест Уэлча) и *p*-value для него за счет пакета программных средств R. Статистически значимым результат признавался при *p*-value < 0.05. Визуализацию данных проводили при помощи пакета программного обеспечения ggpubr R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперимент по влиянию температур. Нами было проведено исследования влияния температур на частоту трансдукции препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой rTurboGFP-B. Исходная концентрация вирулентных частиц в приготовленном нами препарате фага до опыта составляла $(4.95 \pm 3.14) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Частота трансдукции до опыта для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(1.43 \pm 0.47) \cdot 10^{-5}$. В результате 40-минутного воздействия температуры в 65°C на препарат фага число вирулентных частиц упало в ~300000 раз и составляло $(1.63 \pm 1.06) \cdot 10^3$ БОЕ/мл. Частота трансдукции препарата после нагрева снизилась до очень низких значений — мы не получили клетки-трансдуктанты в результате смешения ранее нагретого препарата фага и штамма-реципиента. При комнатной температуре (25°C) титр фага сохранился примерно на том же уровне, что и в начале эксперимента — $(4.69 \pm 2.54) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(1.10 \pm 0.20) \cdot 10^{-5}$, т.е. можно сказать, что изменений не наблюдалось. После хранения препарата во льду титр фага составлял

$(1.38 \pm 0.80) \cdot 10^7$ БОЕ/мл, наблюдалось снижение среднего значения титра по сравнению с контрольным образцом, тем не менее оно оставалось в пределах погрешности измерения. Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(3.36 \pm 0.73) \cdot 10^{-5}$, среднее значение выросло по сравнению с контрольным в ~2.3 раза, а по сравнению с образцом, хранившимся при комнатной температуре в ~3 раза. Данные представлены в табл. 1. Изменений в морфологии колоний трансдуктантов после температурного воздействия выявлено не было, устойчивость сохранялась ко всем трем антибиотикам, наблюдалась экспрессия зеленого флуоресцентного белка у всех полученных колоний.

Эксперимент по влиянию pH. Нами было исследовано влияние различных значений pH на частоту трансдукции препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой rTurboGFP-B. Концентрация вирулентных фаговых частиц в препарате до опыта составляла $(6.0 \pm 2.0) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K до опыта составляла $(1.53 \pm 0.20) \cdot 10^{-5}$. В этом опыте мы предприняли попытки имитации условий, с которыми могут столкнуться трансдуцирующие частицы в условиях желудочно-кишечного тракта. В результате воздействия HCl на препарат фага в течение 40 мин произошла полная инактивация фаговых частиц. Частота трансдукции препарата снизилась до очень низких значений — мы не получили клетки-трансдуктанты в результате смешения препарата фага после воздействия кислоты и штамма-реципиента. В результате воздействия NaOH на препарат фага в течение 40 мин произошла практически полная инактивация фаговых частиц — титр составлял 30 БОЕ/мл. Как и в предыдущем опыте, частота трансдукции упала до очень низких значений — мы не получили

Таблица 1. Данные об изменениях числа фагов и частоты трансдукции rTurbo-GFP-B бактериофагом RB49 в результате воздействия температур

Воздействия на препарат	Средний титр фага $\pm$ SD, БОЕ/мл	Среднее КОЕ трансдуктантов $\pm$ SD, КОЕ	Средняя частота трансдукции, КОЕ/БОЕ	Стандартное отклонение для частоты трансдукции (SD)	Стандартная ошибка среднего для частоты трансдукции (SE)
25°C	$(4.69 \pm 2.54) \cdot 10^7$	102.80 ± 18.83	$1.10 \cdot 10^{-5}$	$2.00 \cdot 10^{-6}$	$6.31 \cdot 10^{-7}$
0°C	$(1.38 \pm 0.8) \cdot 10^7$	92.80 ± 20.29	$3.36 \cdot 10^{-5}$	$7.34 \cdot 10^{-6}$	$2.32 \cdot 10^{-6}$
65°C	$(1.63 \pm 1.06) \cdot 10^3$	0	0	0	0

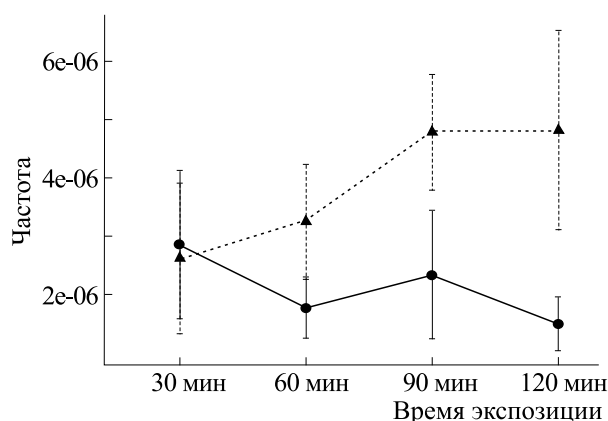


Рис 1. Изменение частоты трансдукции препарата бактериофага RB49 в зависимости от времени экспозиции под УФ-излучением. Треугольниками на графике представлены средние величины частот трансдукций для препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой pTurboGFP-B и подвергнутого УФ-излучению ($\lambda = 366$ нм) с разными временными интервалами, кружками — средние величины частот трансдукции для такого же препарата, пребывающего в темноте.

клетки-трансдуктанты в результате смешения препарата фага после воздействия щелочи и штамма-реципиента. При нормальном pH титр фага сохранялся примерно на том же уровне, что и в начале эксперимента — $(5.5 \pm 0.5) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(1.47 \pm 0.30) \cdot 10^{-5}$, то есть какие либо значительные изменения в контрольном эксперименте не наблюдались.

Эксперимент по влиянию УФ-излучения. Нами было проведено исследование воздействия длинноволнового ультрафиолета ($\lambda = 366$ нм) на частоту трансдукции препарата фага RB49, содержащего вирулентные и трансдуцирующие частицы с плазмидой pTurboGFP-B. Исходная концентрация вирулентных частиц в приготовленном нами препарате фага до опыта составляла $(1.04 \pm 0.38) \cdot 10^8$ БОЕ/мл (контрольный образец). Частота трансдукции для штамма-реципиента *E. coli* 5K до опыта составляла $(2.86 \pm 1.2) \cdot 10^{-6}$. Задачей этого опыта была имитация солнечного излучения, с которым могут столкнуться трансдуцирующие частицы бактериофагов в сточных водах в условиях повышенной инсоляции. При анализе результата воздействия УФ ($\lambda = 366$ нм) на препарат фага с трансдуцирующими частицами была отмечена связь между увеличением времени экспозиции облучения и ростом частоты трансдукции, по сравнению с препаратом, находящимся в темноте. Для препарата, не подвергнутого влиянию УФ-излучения, средняя частота трансдукции была практически неизменной в пределах

погрешности измерений. Результаты представлены на рис. 1 в виде графика.

Стоит отметить, что согласно данным проведенного нами парного *t*-теста с критерием Стьюдента для двух групп (применялся для сравнения контрольных и опытных групп спустя 30–90 минут облучения) и *t*-теста с критерием Уэлча (применялся для сравнения контрольной и опытной группы спустя 120 мин облучения), статистически значимое отличие между частотами трансдукции для препаратов, подвергнувшихся и не подвергнувшихся действию УФ-лучей, начинает появляться только после 60 мин облучения препарата (p -value < 0.01). После 30 мин облучения статистически значимой разницы между частотами трансдукции контрольного и опытного препарата не было выявлено (p -value = 0.6985, *t*-тест Стьюдента). Частота трансдукции препарата, облученного в течение 120 мин, для штамма-реципиента *E. coli* 5K составляла $(4.82 \pm 1.71) \cdot 10^{-6}$, необлученного, оставленного в темноте препарата — $(1.51 \pm 0.45) \cdot 10^{-6}$. Таким образом, за 2 ч облучения УФ ($\lambda = 366$ нм) частота трансдукции препарата выросла в ~3 раза по сравнению с контрольным препаратом, выдержанным в темноте.

Было отмечено падение титра фага с увеличением времени экспозиции, за все время эксперимента (120 мин) средний титр фага упал примерно в ~1.5 раза по сравнению с контрольным образцом — $(6.56 \pm 0.98) \cdot 10^7$ БОЕ/мл и в 1.8 раза по сравнению с образцом, находящимся в темноте в этот же период времени, его титр составил $(1.22 \pm 0.23) \cdot 10^8$ БОЕ/мл. Подробные данные об изменениях титра фага в этих опытах представлены в табл. 2, а данные о количестве трансдуктантов и частоте трансдукции — в табл. 3.

Была проведена оценка изменений морфологии трансдуктантов, полученных за счет препарата фага, подвергнутого действию УФ. Визуально детектируемых изменений в морфологии колоний выявлено не было, устойчивость сохранялась ко всем трем селективным антибиотикам, наблюдалась экспрессия зеленого флуоресцентного белка у всех полученных колоний. На рис. 2 представлены фото колоний трансдуктантов, полученных в этой серии опытов.

Из линии трансдуктантов, полученных в результате данного опыта была выделена плазмидная ДНК для изучения возможных изменений. На рис. 3 представлены результаты рестрикционного анализа плазмидной ДНК. Для рестрикционного анализа нами была использована эндонуклеаза рестрикции PvuII (CAGCTG). Выбранная нами плазида несет один сайт узнавания для PvuII, находящийся в области гена устойчивости к хлорамфениколу. Было показано, что во всех клонах-трансдуктантах присутствует плазида,

Таблица 2. Данные об изменениях титра бактериофага RB49 в результате воздействия УФ-излучения ($\lambda = 366$ нм)

Воздействия на препарат	Время воздействия, мин	Число измерений титра фага (n)	Средний титр, БОЕ/мл	Стандартное отклонение (SD)	Стандартная ошибка среднего (SE)
УФ-излучение	30	10	$1.11 \cdot 10^8$	$1.97 \cdot 10^7$	$6.23 \cdot 10^6$
УФ-излучение	60	10	$7.08 \cdot 10^7$	$1.29 \cdot 10^7$	$4.09 \cdot 10^6$
УФ-излучение	90	10	$8.30 \cdot 10^7$	$1.16 \cdot 10^7$	$3.68 \cdot 10^6$
УФ-излучение	120	10	$6.56 \cdot 10^7$	$9.83 \cdot 10^6$	$3.11 \cdot 10^6$
Без воздействия (нахождение в темноте)	30	10	$1.04 \cdot 10^8$	$3.87 \cdot 10^7$	$1.19 \cdot 10^7$
Без воздействия (нахождение в темноте)	60	10	$1.06 \cdot 10^8$	$2.84 \cdot 10^7$	$8.97 \cdot 10^6$
Без воздействия (нахождение в темноте)	90	10	$1.18 \cdot 10^8$	$3.19 \cdot 10^7$	$1.01 \cdot 10^7$
Без воздействия (нахождение в темноте)	120	10	$1.22 \cdot 10^8$	$2.35 \cdot 10^7$	$7.42 \cdot 10^6$

Таблица 3. Данные об изменениях частоты трансдукции рTurbo-GFP-В бактериофагом RB49 в результате воздействия УФ-излучения ($\lambda = 366$ нм)

Воздействия на препарат	Время воздействия, мин	Число измерений (n)	Среднее КОЕ трансдуктантов $\pm$ SD, КОЕ	Средняя частота трансдукции, КОЕ/БОЕ	Стандартное отклонение для частоты трансдукции (SD)	Стандартная ошибка среднего для частоты трансдукции (SE)
УФ-излучение	30	10	29.20 ± 14.24	$2.63 \cdot 10^{-6}$	$1.28 \cdot 10^{-6}$	$4.06 \cdot 10^{-7}$
УФ-излучение	60	10	23.00 ± 7.01	$3.25 \cdot 10^{-6}$	$9.90 \cdot 10^{-7}$	$3.13 \cdot 10^{-7}$
УФ-излучение	90	10	39.60 ± 8.14	$4.77 \cdot 10^{-6}$	$9.81 \cdot 10^{-7}$	$3.10 \cdot 10^{-7}$
УФ-излучение	120	10	31.60 ± 11.19	$4.82 \cdot 10^{-6}$	$1.71 \cdot 10^{-6}$	$5.39 \cdot 10^{-7}$
Без воздействия (нахождение в темноте)	30	10	29.70 ± 13.26	$2.86 \cdot 10^{-6}$	$1.27 \cdot 10^{-6}$	$4.03 \cdot 10^{-7}$
Без воздействия (нахождение в темноте)	60	10	18.90 ± 5.40	$1.78 \cdot 10^{-6}$	$5.10 \cdot 10^{-7}$	$1.61 \cdot 10^{-7}$
Без воздействия (нахождение в темноте)	90	10	27.70 ± 13.07	$2.35 \cdot 10^{-6}$	$1.11 \cdot 10^{-6}$	$3.50 \cdot 10^{-7}$
Без воздействия (нахождение в темноте)	120	10	18.40 ± 5.46	$1.51 \cdot 10^{-6}$	$4.48 \cdot 10^{-7}$	$1.42 \cdot 10^{-7}$

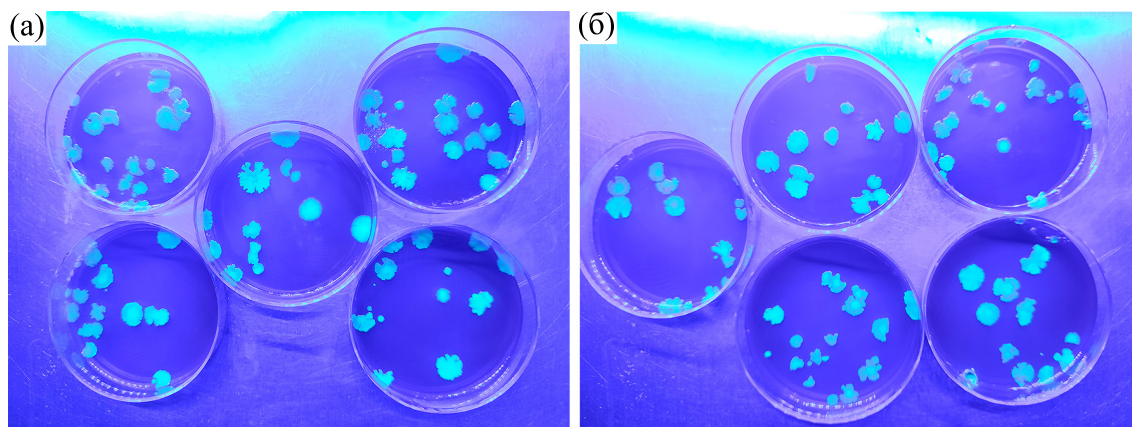


Рис 2. (а) — Колонии трансдуктантов *E. coli* 5K, полученные за счет действия находившегося в течение 120 мин в темноте препарата фага RB49 с трансдуцирующими частицами, несущими плазмиду pTurboGFP-B. (б) — Колонии трансдуктантов *E. coli* 5K, полученные за счет действия находившегося в течение 120 мин под действием УФ-излучения ($\lambda = 366$ нм) препарата фага RB49 с трансдуцирующими частицами, несущими плазмиду pTurboGFP-B. Для выявления флуоресценции использовали лампу, излучающую синий свет ($\lambda \sim 455$ нм).

имеющая в линейаризованной форме ожидаемый размер пределах 4000 п.н. Однако плазмидная ДНК, выделенная из клона-трансдуктанта, полученного за счет трансдукции препаратом, облученным в течение 2 ч, по всей видимости, не полностью гидролизовалась под действием рестрик-

тазы (рис. 3, образец 5). На геле мы наблюдали дополнительную полосу длиной 8000 п.н., что соответствует длине димера данной плазмиды. Вероятно, это может быть связано с появлением большого количества фотопродуктов в плазмидной ДНК и их последующей репарацией, приво-

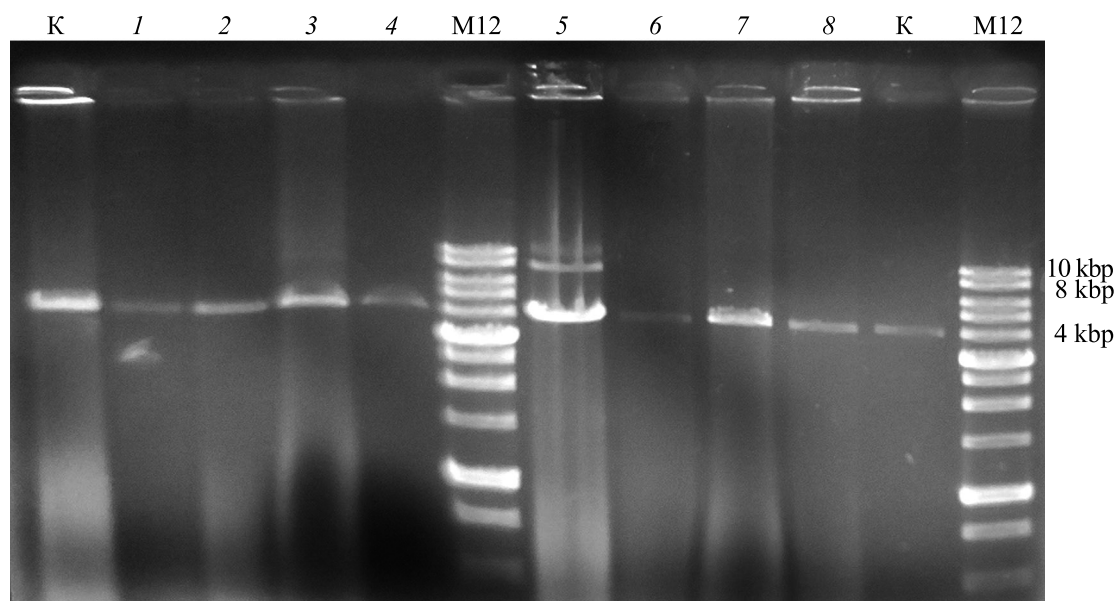


Рис 3. Результаты рестрикционного анализа плазмид pTurboGFP-B, выделенных из трансдуктантов *E. coli* 5K. 1-4 плазмидная ДНК pTurboGFP-B, выделенная из трансдуктантов *E. coli* 5K, полученных за счет действия находившегося в темноте препарата фага RB49 с трансдуцирующими частицами в течение 30 мин (дорожка 1), 60 мин (дорожка 2), 90 мин (дорожка 3), 120 мин (дорожка 4). Дорожки 5–8 — плазмидная ДНК pTurboGFP-B, выделенная из трансдуктантов *E. coli* 5K, полученных за счет действия облученного УФ ($\lambda = 366$ нм) препарата фага RB49 с трансдуцирующими частицами в течение: 120, 90, 60 и 30 мин соответственно. Дорожки «К» (контроль) — плазмидная ДНК из штамма 5K/pTurboGFP-B, на основе которого были получены трансдуцирующие частицы RB49. Дорожки «M12» — ДНК-маркер M12 (SybEnzyme, Россия). Рестрикционный анализ проводили эндонуклеазой рестрикции PvuII. Плазмида имеет один сайт для рестриктазы PvuII, что позволяет привести плазмиду к линейной форме и оценить ее размер. Размер полученных фрагментов в пределах 4000 п.н., что соответствует размеру плазмиды pTurboGFP-B

дающей к заменам нуклеотидов, в том числе и в сайтах рестриктазы PvuII.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами был проведен ряд опытов по воздействию физико-химических факторов, с которыми бактериофаги RB49 могут столкнуться, находясь в одной из своих ниш обитания. Ранее подобные опыты с использованием данной группы бактериофагов не проводились, наши эксперименты являются первыми.

На основании полученных данных мы предполагаем, что трансдуцирующие частицы фага RB49, содержащие плазмиду pTurboGFP-B, хуже сохраняются при температуре 60°C и выше. Это может быть обусловлено несколькими причинами. Первая — небольшое количество трансдуцирующих частиц в составе препарата — согласно расчетам, исходя из частоты трансдукции, в препарате должно быть не менее 100 частиц в 1 мл. Температура в 65°C способна привести к разрушению такого небольшого количества фаговых капсидов за использованный нами временной интервал, вне зависимости от того, какая ДНК в них упакована. Вторая причина может быть связана со структурой самих частиц — возможно, трансдуцирующая частица фага RB49 с упакованным в нее конкатемером из плазмид менее стабильна, чем вирулентная. Проверить это предположение можно будет при помощи схожего опыта — но подвергать воздействию температуры нужно будет равное количество трансдуцирующих и вирулентных частиц, полностью очищенных друг от друга. Мы предполагаем, что использованный нами метод нагрева на водяной бане с температурой, близкой к температуре пастеризации, можно будет использовать для полной очистки препарата от трансдуцирующих частиц.

Интересен результат, полученный для препарата, хранящегося во льду. Мы наблюдали незначительное снижение титра вирулентных частиц фага RB49, при возросшей частоте трансдукции. Мы пока не можем точно сказать, что в условиях, близких к 0°C, трансдуцирующие частицы будут лучше сохраняться, однако, согласно нашим неопубликованным данным, подобные препараты фага RB43 с плазмидой pBR322, хранящиеся при температуре 5–7°C в течение нескольких лет, имеют тенденцию к увеличению частоты трансдукции и снижению титра вирулентных частиц в долгосрочной временной перспективе.

На основании опытов по воздействию NaOH и HCl на препарат фага мы предполагаем, что трансдуцирующие частицы RB49 с плазмидой pTurboGFP-B не сохраняются при воздействии щелочного pH (9.0 и более), оба типа частиц в препарате с концентрацией 10⁷ БОЕ/мл и ниже могут

инактивироваться в условиях желудочного сока за 40 мин. По всей видимости, бактериофаг RB49 менее устойчив к изменениям pH по сравнению с другим представителем T4-родственных бактериофагов — исследованным ранее фагом T4 [25]. Возможно, это связано с отличиями в структуре белков капсида этих фагов.

На основе полученных экспериментальных данных о влиянии УФ-излучения на препарат фага с трансдуцирующими частицами можно сделать предположение о том, что трансдуцирующие частицы RB49, несущие плазмиду pTurboGFP-B, могут быть более устойчивы к действию длинноволнового УФ-излучения, чем вирулентные частицы RB49. Результат рестрикционного анализа облученной плазмидной ДНК из трансдуктантов не так однозначен. Нами было замечено, что плазмидная ДНК, выделенная из трансдуктантов, полученных за счет облученного УФ в течение 2 ч препарата фага, гидролизовалась не полностью. Возможно, это связано с избыточностью субстрата для фермента и за 2 ч часть ДНК не успела перейти в линейную форму. Также объяснением этого результата может быть то, что спустя 2 ч облучения плазмидная ДНК в трансдуцирующих частицах получает достаточное количество фотоповреждений для того, чтобы стать более устойчивой к действию эндонуклеаз рестрикции. В ранних исследованиях было отмечено, что существует корреляция между степенью повреждения УФ-излучением плазмидной ДНК и ее устойчивостью к действию рестриктаз [26]. В нуклеиновых кислотах наиболее легко при действии длинноволнового УФ-излучения окисляется гуанин (G), образуя 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксо-G) и другие продукты [27]. Сайт узнавания выбранной нами эндонуклеазы рестрикции PvuII содержит несколько гуанинов, которые вполне могли бы образовать упомянутые выше фотопродукты. После того, как поврежденная плазмидная ДНК попадет в клетку из трансдуцирующей частицы, может запуститься процесс репарации полученных фотоповреждений. Репарация может протекать с ошибками, это в свою очередь может привести к небольшому изменению нуклеотидного состава и потере сайта узнавания, выбранной нами рестриктазы PvuII. Как следствие, часть выделенной нами плазмидной ДНК не смогла гидролизоваться во время проведения рестрикционного анализа. Стоит отметить, что трансдуктанты, полученные за счет частиц, подвергавшихся облучению в течение 2 ч, сохраняли способность к росту на селективной среде с добавлением антибиотиков и флуоресцировали в синем свете. Следовательно, сохранилась экспрессия генов антибиотикорезистентности и зеленого флуоресцентного белка с поврежденной плазмидной ДНК из облученной трансдуцирующей частицы. Для подтверждения нашей гипоте-

зы о фотоповреждениях ДНК в трансдуцирующих частицах необходимо проводить дальнейшее исследование выделенной плазмидной ДНК из трансдуктантов, включая повторный рестрикционный анализ в том числе с использованием других эндонуклеаз рестрикции.

На основе совокупности этих данных, мы предполагаем, что устойчивость трансдуцирующих частиц к УФ-излучению скорее всего связана с большим числом копий плазмид в капсиде. Длина плазмиды pTurboGFP-B составляет 4100 п.н., тогда как капсид фага RB49 может вместить в себя до 164018 п.н. в соответствии с длиной своего генома. Следовательно, в трансдуцирующей частице фага RB49 может находиться около 40 мономерных копий плазмиды pTurboGFP-B. Большое число копий плазмидной ДНК позволяет лучше сохранить и реализовать генетическую информацию, переносимую трансдуцирующей частицей, в отличие от вирулентной, где содержится лишь одна копия вирусного генома. Тем не менее, с увеличением дозы мутагенного фактора чаще происходит и накопление мутаций в последовательности. В зависимости от работы систем репарации клетки, количества и типа повреждений, будет зависеть, как будет идти экспрессия генов, которую внесла в клетку трансдуцирующая частица. В случае нашего эксперимента доза длинноволнового УФ-излучения, накопленная за 2 ч, недостаточна, чтобы полностью нарушить экспрессию генов антибиотикорезистентности и зеленого флуоресцентного белка, но недостаточна для того, чтобы часть сайтов стала недоступной для распознаваний ими рестриктаз. Можно сказать, что трансдуцирующие частицы фагов, содержащие хозяйскую ДНК (в частности конкатемер из десятков копий плазмид) вместо собственной, являются неким «защищенным хранилищем» информации, получаемой от бактерии-хозяина, которую они могут передать новому штамму-реципиенту. При этом за счет большого количества копий передаваемой информации, бактерия-реципиент с большей вероятностью приобретет новый признак по сравнению с другими механизмами горизонтального переноса генов. Таким образом, вклад фагов, способных к генерализованной трансдукции, в горизонтальный перенос генов и коэволюцию бактерий-хозяев в хорошо освещенных водных экотопах может быть выше, чем предполагалось ранее. Описанные нами выше процессы могут происходить в хорошо освещенных водоемах, в которые попадают фекальные сточные воды, в которых, в свою очередь, могут встречаться фаги, родственные RB49.

ВЫВОДЫ

На основе проведенной нами серии экспериментов, мы предполагаем, что при определенных

условиях — температура, близкая к 0°C, и повышенная инсоляция — трансдуцирующие частицы могут достаточно хорошо сохраняться и обеспечивать процесс трансдукции не менее эффективно, чем при нормальных условиях. Эти данные могут свидетельствовать о возможности более интенсивного горизонтального переноса генов в водных экотопах посредством фаговой трансдукции, чем предполагалось ранее. Более того, за счет большей устойчивости в вышеописанных условиях, трансдуцирующие частицы могут быть «резервуаром» для хранения большого объема генетической информации в течение долгого времени, скорее всего, это свойство определяется количеством и множественностью копий генетического материала, упакованного в капсид фага.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-26-00205, <https://rscf.ru/project/24-26-00205/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernández L., González S., Quiles-Puchalt N., Gutiérrez D., Penadés J. R., García P., and Rodríguez A. Lysogenization of *Staphylococcus aureus* RN450 by phages ϕ 11 and ϕ 80 α leads to the activation of the SigB regulon. *Sci. Rep.*, **8** (1), 12662 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-31107-z
2. Casjens S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microbiol.*, **49**, 277–300 (2003). DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03580.x.
3. Plunkett G. 3rd, Rose D. J., Durfee T. J., and Blattner F. R. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J. Bacteriol.*, **181** (6), 1767–1778 (1999). DOI: 10.1128/JB.181.6.1767-1778.1999
4. Howard-Varona C., Vik D. R., Solonenko N. E., Li Y. F., Gazitua M. C., Chittick L., Samiec J. K., Jensen A. E., Anderson P., Howard-Varona A., Kinkhabwala A. A., Abedon S. T., and Sullivan M. B. Fighting Fire with Fire: Phage Potential for the Treatment of *E. coli* O157 Infection. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **7** (4), 101 (2018). DOI: 10.3390/antibiotics7040101

5. Torres-Barceló C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg. Microbes Infect.*, **7** (1), 168 (2018). DOI: 10.1038/s41426-018-0169-z
6. Varga M., Pantu Ček R., Ru Žičková V., and Doškař J. Molecular characterization of a new efficiently transducing bacteriophage identified in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Virol.*, **97** (1), 258–268 (2016). DOI: 10.1099/jgv.0.000329
7. Varga M., Kuntová L., Pantůček R., Mašláňová I., Růžicková V., and Doškař J. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol. Lett.*, **332** (2), 146–152 (2012). DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02589.x
8. Chiang Y. N., Penadés J. R., and Chen J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog.*, **15** (8) (2019). DOI: 10.1371/journal.ppat.1007878
9. Thierauf A., Perez G., and Maloy A. S. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.*, **501**, 267–286 (2009). DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_23
10. Humphrey S., Fillol-Salom A., Quiles-Puchalt N., Ibarra-Chávez R., Haag A. F., Chen J. and Penadés J. R. Bacterial chromosomal mobility via lateral transduction exceeds that of classical mobile genetic elements. *Nature Commun.*, **12** (1), 6509 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-26004-5
11. Fillol-Salom A., Bacigalupe R., Humphrey S., Chiang Y. N., Chen J., and Penadés J. R. Lateral transduction is inherent to the life cycle of the archetypical *Salmonella* phage P22. *Nature Commun.*, **12** (1), 6510 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-26520-4
12. Chiang Y. N., Penadés J. R., and Chen J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog.*, **15** (8) (2019). DOI: 10.1371/journal.ppat.1007878
13. Tanyashin V. I., Zimin A. A., Shlyapnikov M. G., and Boronin A. M. Transduction of Plasmid Antibiotic Resistance Determinants with PseudoT-Even Bacteriophages. *Rus. J. Genet.*, **39**, 761–772 (2003). DOI: 10.1023/A:1024748903232
14. Никулина А. Н., Зимин А. А. и Кошаев А. Г. Изучение влияния температуры на трансдукционную способность и литическую активность бактериофагов RB43 и RB49. *Труды Кубанского гос. аграрного ун-та*, **101**, 283–292 (2022). DOI: 10.21515/1999-1703-101-283-292
15. Simmonds P., Adriaenssens E. M., Zerbini F. M., Abrescia N. G. A., Aiewsakun P., Alfnas-Zerbini P., Bao Y., Barylski J., Drostén Ch., Duffy S., Duprex W. P., Dutilh B. E., Elena S. F., García M. L., Junglen S., Katzourakis A., Koonin E. V., Krupovic M., Kuhn J. H., Lambert A. J., Lefkowitz E. J., Łobocka M., Lood C., Mahony J., Meier-Kolthoff J. P., Mushegian A. R., Oksanen H. M., Poranen Minna M., Reyes-Muñoz A., Robertson D. L., Roux S., Rubino L., Sabanadzovic S., Siddell S., Skern T., Smith D. B., Sullivan M. B., Suzuki N., Turner D., Van Doorslaer K., Vandamme A.-M., Varsani A., and Vasilakis N. Four principles to establish a universal virus taxonomy. *PLoS Biol.*, **21** (2), e3001922 (2023). DOI: 10.1371/journal.pbio.3001922
16. Monod C., Repoila F., Kutateladze M., Tétart F., and Krisch, H. M. The genome of the pseudo T-even bacteriophages, a diverse group that resembles T4. *J. Mol. Biol.*, **267** (2), 237–249 (1997). DOI: 10.1006/jmbi.1996.0867
17. Gao S., Zhang L., and Rao V. B. Exclusion of small terminase mediated DNA threading models for genome packaging in bacteriophage T4. *Nucl. Acids Res.*, **44** (9), 4425–4439 (2016). DOI: 10.1093/nar/gkw184
18. Gao S. and Rao V. B. Specificity of interactions among the DNA-packaging machine components of T4-related bacteriophages. *J. Biol. Chem.*, **286** (5), 3944–3956 (2011). DOI: 10.1074/jbc.M110.196907
19. Rao V.B., Fokine A., Fang Q., and Shao Q. Bacteriophage T4 head: structure, assembly, and genome packaging. *Viruses*, **15** (2), 527 (2023). DOI: 10.3390/v15020527
20. Takahashi H. and Saito H. Mechanism of pBR322 transduction mediated by cytosine-substituting T4 bacteriophage. *Mol. Gen. Genet.*, **186** (4), 497–500 (1982). DOI: 10.1007/BF00337955
21. Wilson G. G., Young K. Y., Edlin G. J., and Konigsberg W. High-frequency generalised transduction by bacteriophage T4. *Nature*, **280** (5717), 80–82 (1979). DOI: 10.1038/280080a0
22. Kreuzer K. N. and Alberts B. M. Characterization of a defective phage system for the analysis of bacteriophage T4 DNA replication origins. *J. Mol. Biol.*, **188** (2), 185–198 (1986). DOI: 10.1016/0022-2836(86)90303-7
23. Маниатис Т., Фрич Э. и Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование* (Мир, М., 1984).
24. Jofre J. and Muniesa M. Bacteriophage Isolation and Characterization: Phages of *Escherichia coli*. *Methods Mol. Biol.*, **2075**, 61–79 (2020). DOI: 10.1007/978-1-4939-9877-7_4
25. Majewska J., Miernikiewicz P., Szymczak A., Kaźmierczak Z., Goszczyński T. M., Owczarek B., Rybicka I., Ciekot J., and Dąbrowska K. Evolution of the T4 phage virion is driven by selection pressure from non-bacterial factors. *Microbiol. Spectrum*, **11** (5), e00115-23 (2023). DOI: 10.1128/spectrum.00115-23
26. Kejnovský E., Nejedlý K., and Kypr J. Factors influencing resistance of UV-irradiated DNA to the restriction endonuclease cleavage. *Int. J. Biol. Macromol.*, **34** (3), 213–222 (2004). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2004.04.004
27. Nelson K. L., Boehm A. B., Davies-Colley R. J., Dodd M. C., Kohn T., Linden K. G., Liu Yu., Maracini P. A., McNeill K., Mitch W. A., Nguyen Th. H., Parker K. M., Rodriguez R. A., Sassoubre L. M., Silverman A. I., Wigginton K. R., and Zepp R. G. Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of mechanisms and modeling approaches. *Environ. Sci. Process Impacts*, **20** (8), 1089–1122 (2018). DOI: 10.1039/c8em00047f

Study of the Influence of Physicochemical Factors on Frequency of Plasmid Transduction by Bacteriophage RB49

A.N. Nikulina*, N.A. Nikulin*, and A.A. Zimin*

**G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The T4-related bacteriophage RB49 is capable of generalized transduction of plasmids at a relatively high frequency. Due to this mechanism, bacteria can obtain the ability to adapt to varying environmental conditions and survive in new ecological niches. The effect of pH, temperature and long-wave ultraviolet irradiation ($\lambda = 366$ nm) on the characteristics of the RB49 phage preparation containing transducing particles with pTurboGFP-B plasmid DNA and virulent particles which have their own DNA. The data were obtained for the changes in the titer of virulent particles and the frequency of transduction of the pTurboGFP-B plasmid by the RB49 phage. Two hours after exposure of the pTurboGFP-B plasmid to UV radiation, the frequency of plasmid transduction by the RB49 phage increased by a factor of ~ 3 . Also, after 40 min storage of the phage in ice, the number of transducing particles produced was many folds greater. Based on the data gathered in the experiment, it is suggested that transducing particles of the RB49 phage can be more resistant to long-wave UV radiation and temperatures close to 0°C than virulent particles and are able to provide the transduction process more effectively than under normal conditions. Similar processes may occur in well-lit water bodies including cold-water reservoirs where the phages related to RB49 can be found. This might be an indication of the potential of more intense horizontal gene transfer in aquatic ecotopes than previously thought.

Keywords: bacteriophage RB49, plasmid transduction, UV, horizontal gene transfer