

**Т.В. Иваница<sup>2</sup>, К.Д. Крылова<sup>2</sup>, Ж.Ю. Сергеева<sup>2</sup>, Ф.И. Товкач<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д03680, Украина

<sup>2</sup> Одесский национальный университет им. П.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

## **ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ И ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ (VLP) *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *CAROTOVORA***

Неполные или дефектные бактериофаги *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Есс) представляют собой набор отдельных вирусоподобных частиц (VLP), из которых формируется вирион: фаговые хвостовые отростки, капсидные образования и базальные пластины. Кроме того, индуцированные лизаты Есс могут содержать и другие типы VLP: отдельные стержни и чехлы, полистержни и полчехлы. Для анализа всего набора частиц предложен хроматографический анализ на волокнистой ДЕАЕ целлюлозе 23 SS с последующей электронной микроскопией VLP. Установлено, что хроматографические профили VLP, которые способны убивать чувствительные бактерии, являются уникальными и консервативными признаками полилизогенных штаммов *E. carotovora*. Однако в случае изогенных штаммов они полностью совпадают. При использовании определенного набора индикаторных штаммов VLP-профили могут характеризовать не только дефектную, но и истинную лизогению эрвиний. Электронномикроскопические исследования показали, что при одинаковых VLP-профилях двух изогенных штаммов количество и типы фаговых частиц могут существенно отличаться. В индуцированном лизате Есс 48А-7/4b удалось обнаружить не только избыток фаговых базальных пластинок, но и новый тип фаговых хвостовых отростков. Так как в этом штамме других изменений, кроме транспозиции Tn9 в критическую плазмиду рСА25, не произошло, можно предположить, что эта небольшая экстрахромосома существенно влияет на репликацию бактериальной ДНК и соответственно на общую динамику хромосомы *E. carotovora*.

*Ключевые слова:* *Erwinia carotovora*, дефектная полилизогения, вирусоподобные частицы, хроматография, электронная микроскопия.

Лизогенное состояние бактериальной клетки имеет непосредственное отношение к её жизнедеятельности, особенно в том случае, когда это касается формирования патогенности и вирулентности [1]. Занимая значительную часть генома, профаговые элементы способны осуществлять не только экспрессию, но и горизонтальный перенос генетических детерминант патогенности и вирулентности, как с помощью полноценных [2], так и неполных фагов [3]. В редких случаях индуцированные частицы дефектных фагов составляют подавляющее большинство в общем пуле частиц некоторых бактерий [4].

Дефектная полилизогения важного фитопатогена *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Есс) проявляется через киллерную активность бактериоцинов типа фаговых хвостовых отростков или макромолекулярных каротоворицинов – MCTV [5]. Кроме того при лизогенной индукции формируются и вирусоподобные частицы без киллерной активности – капсиды, прокапсиды, базальные пластинки.

Данные обстоятельства предполагают необходимость разработки надежного подхода для оценки лизогенного состояния того или иного штамма Есс на основе количественных показателей киллерной активности и морфологии вирусоподобных частиц (VLP). В связи с этим цель представленной работы состояла в сравнительном изучении лизогении различных штаммов с использованием хроматографических профилей биологически активных VLP и их морфологических типов, установленных с помощью электронной микроскопии.

**Материалы и методы.** В качестве продуцентов вирусных и вирусоподобных частиц были использованы три штамма *E. carotovora* subsp. *carotovora*: ZM1 [6]; 48А, предоставленный профессором Евтушенковым В.Н., Белорусский государственный Университет, г. Минск; изогенный по отношению к последнему штамм 48А-7/4b, полученный в [7].

Для тестирования MCTV и колициноподобных каротоворицинов применяли индикаторные культуры Есс 62А, ZM1, J2, 62А/RC5297 и *Escherichia coli* С600, НВ101 и ВЕ.

Получение вирусоподобных частиц под воздействием митомицина С проводили в среде А с глюкозой по следующей схеме. Ночную культуру Есс подращивали при активной аэрации до экспоненциальной фазы роста клеток и добавляли митомицин С в концентрации 1 мкг/мл.

©Т.В. Иваница, К.Д. Крылова, Ж.Ю. Сергеева, Ф.И. Товкач, 2011

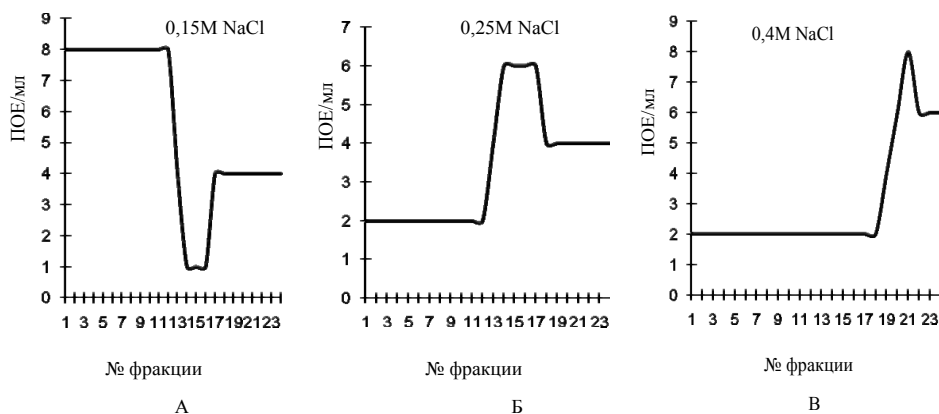
Продолжали инкубирование еще в течение 1 часа, после этого культуру оставляли лизировать при комнатной температуре на 18 часов, без аэрации. Полученные лизаты осаждали в течение часа при 5000g, 4 °С. Супернатант центрифугировали снова при 25000 оборотов 3 часа, 10 °С, в роторе SW25, Spinco. Полученный осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера STMG или STMF. Полученную суспензию освобождали от остатков клеток и конгломератов фаговых частиц путем их осаждения на микроцентрифуге ELM1 при 11000 об/мин в течение 5 мин.

Для получения очищенных и сконцентрированных образцов VLP митомидициновые лизаты клеток Есс ZM1 наносили на колонку с DEAE-целлюлозой 23 SS, уравновешенную 0,01 М натрий фосфатным буфером. Далее проводили поэтапную (дробную) элюцию вирусодержащего материала, используя 0,15; 0,25 и 0,4 М растворы NaCl. После этого все фракции, полученные в результате трёх этапов, были протестированы на наличие киллерной активности относительно индикаторных штаммов *E. carotovora* и *Escherichia coli*. Пиковые фракции, каждой серии объединяли и центрифугировали на центрифуге Spinco L7-70 в роторе SW28 при 26000 об/мин, 4 часа, 10 °С. Затем осадки растворяли в буфере STMG. В последующем индивидуальную фракцию обозначали цифрой в числителе, а через косую линию цифрой в знаменателе – концентрацию NaCl в молях, которая использовалась для дробной элюции. Например, выражение 10/0,15 означает, что речь идет о фракции № 10 из первой серии, элюированной 0,15 М раствором NaCl.

Полученную вирусную суспензию анализировали с помощью электронной микроскопии. Для электронномикроскопических исследований использовали препараты фаговых частиц, MCTV и VLP полученных либо с помощью ультрацентрифугирования, или очищенные ионообменной хроматографией. Очищенную суспензию наносили на поддерживающие сетки со слоем нитроцеллюлозы, полученной с 1% ее раствора в амилацетате. На этих сетках образцы выдерживали от 20 до 60 мин, а затем контрастировали 2%-ным уранил ацетатом. Исследования проводили с использованием электронного микроскопа JEOL 1400 (Япония). VLP наблюдали при инструментальном увеличении 30000-40000×.

Биологическая активность MCTV и CCTV определяли в пятнообразующих единицах на мл (ПОЕ/мл) [7].

**Результаты.** В процессе исследований было установлено, что для первой серии дробной элюции митомидицинового лизата, получаемой на DEAE-целлюлозе 23SS с помощью 0,15М NaCl, активность бактериоцинов *E. carotovora* subsp. *carotovora* ZM1 ассоциирована в основном с начальными (1/0,15 - 12/0,15) фракциями. Отсутствие четко выраженного пика активности на хроматограмме может свидетельствовать в пользу неполного связывания VLP с носителем колонки (рис. 1, А). Очевидно, что разделение этих частиц возможно при изменении параметров колонки или условий элюции.



**Рис. 1. Хроматографические профили VLP штамма Есс ZM1 полученные при элюции DEAE колонки 0,15М (А); 0,25М (Б); 0,4М (В), индикаторная культура Есс 66А. Здесь и на последующих графиках на оси абсцисс указан номер фракции, на оси ординат – активность каротоворицинов в пятнообразующих единицах на мл (ПОЕ/мл).**

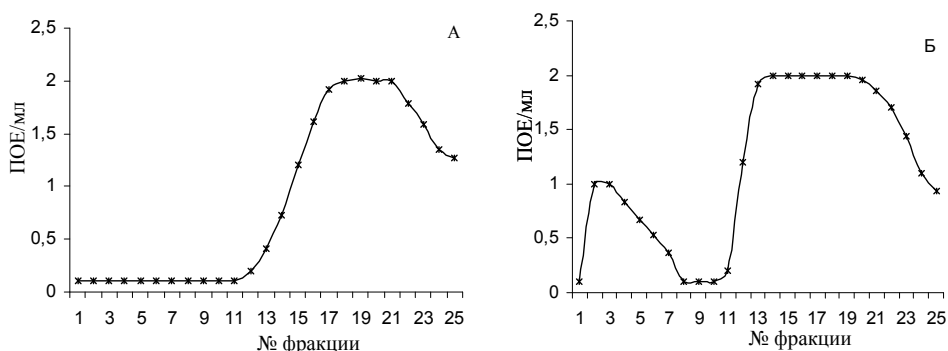
Субстанция со значительной киллерной активностью в отношении штамма Есс 66А, которая формирует четко выраженный пик, была обнаружена во фракциях от 12/0,25 до 17/0,25 (рис. 1, Б). В третьем варианте элюции хроматографической колонки, осуществляемой 0,4 М раствором NaCl, пик активности киллеров приходится на фракции 19/0,4 – 22/0,4.

Представленные результаты (рис. 1) показывают, что популяция дефектных фаговых частиц, полученных обработкой клеток *E. carotovora* митомицином С, может быть разделена дробной элюцией ДЕАЕ-колонки 0,15; 0,25 и 0,4М растворами хлорида натрия. С другой стороны, любая популяция VLP может быть охарактеризована определенным хроматографическим профилем, который отражает активность и количество частиц, способных убивать чувствительный штамм.

Так, например, митомициновый лизат штамма Есс ZM1 содержит не менее трёх активных VLP с различным сродством к ионообменнику, которые имеют отношение к дефектным фагам. Вероятнее всего, они входят в состав бактериального генома Есс ZM1 как отдельные профаговые элементы.

Особенность штамма *E. carotovora* subsp. *carotovora* 48А, неизогенного по отношению к Есс ZM1, состоит в том, что препараты МСТВ данного штамма способны лизировать не только *E. carotovora*, но и *E. coli* [8]. При элюции VLP указанной бактерии 0,15М NaCl обнаружено, что хроматографический профиль киллерной активности (индикатор Есс J2) почти в точности повторяет таковой для VLP штамма Есс ZM1. Кроме того, при использовании в качестве индикаторных штаммов *E. coli* BE, С600 и НВ101 он фактически не изменяется.

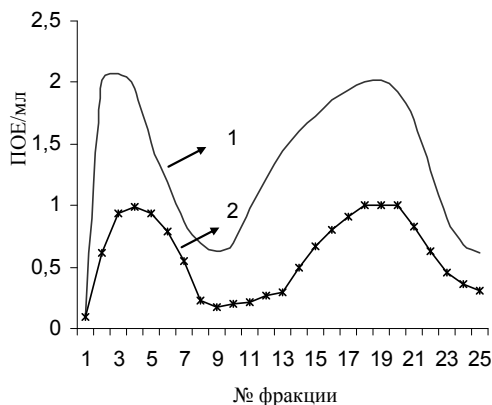
При фракционировании колонки 0,25М NaCl (рис. 2, А) на всех индикаторных штаммах (*E. coli* BE, С600, НВ101, Есс ZM1 и J2) обнаруживается единственный пик активности, наблюдаемый в диапазоне фракций от 11 до 25. В отличие от VLP штамма ZM1 активные частицы Есс 48А не формируют четко выраженного максимума. Вследствие того, что элюцию стандартной колонки проводили в строго контролируемых условиях, то смещение пика активности VLP 48А вправо (рис. 2, А) по отношению к пику активности VLP ZM1, свидетельствует об их различном сродстве к ионообменнику. Эти результаты указывают на существенную разницу в хроматографических профилях биологически активных VLP штаммов различного происхождения. Более показательным является сравнение хроматографических профилей VLP двух неизогенных штаммов при их элюции 0,4 М NaCl. Как видно с хроматограммы, представленной на (рис. 2, Б), киллеры штамма 48А формируют два пика, тогда как таковые штамма ZM1 представлены одним высокоактивным каротоворицином (рис. 1, В), который в независимых исследованиях идентифицирован как низкомолекулярный колициноподобный каротоворицин (ССТV) [9].



**Рис. 2. Профили VLP штамма Есс 48А после элюции ДЕАЕ-колонки 0,25М (А) и 0,4 М NaCl (Б).**

Далее сравнивали изогенную пару штаммов Есс 48А и Есс 48А-7/4b. Эти две бактерии отличаются между собой отсутствием и наличием в криптоической эндогенной плазмиде рСА25 транспозона Тп9, соответственно [10]. Задача состояла в том, чтобы определить, как влияет небольшая вставка (2,7 кб) в экстрахромосомальную ДНК на индуцированный выход частиц дефектных фагов *E. carotovora*.

Анализ хроматографических профилей показал, что выход активных VLP-киллеров у штамма Есс 48А-7/4b существенно не отличается от такового родительского штамма Есс 48А. Установлено, что амплитуда и форма хроматографических кривых может незначительно изменяться в зависимости от чувствительности используемого индикатора, тогда как максимумы пиков не изменяют своего положения (рис. 3).

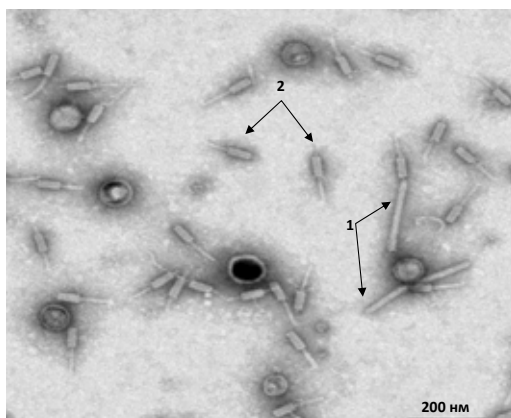


**Рис. 3. Хроматографический профиль МСТV штамма Есс 48А-7/4b при элюции раствором 0,4 М NaCl. Тестирование проводили на индикаторных культурах Есс 66А (1) и *E.coli* С600 (2).**

Исходя из представленных результатов сравнительного изучения двух изогенных штаммов можно утверждать о том, что хроматографические профили биологически активных VLP являются консервативным признаком *E. carotovora* и могут быть использованы в качестве дополнительной характеристики того или иного штамма этой бактерии.

Для того чтобы соотнести киллерную активность соответствующих дефектных частиц с реальными макромолекулярными структурами, и идентифицировать биологически неактивные фаговые структуры, проводили электронно микроскопические исследования содержимого основных пиковых фракций.

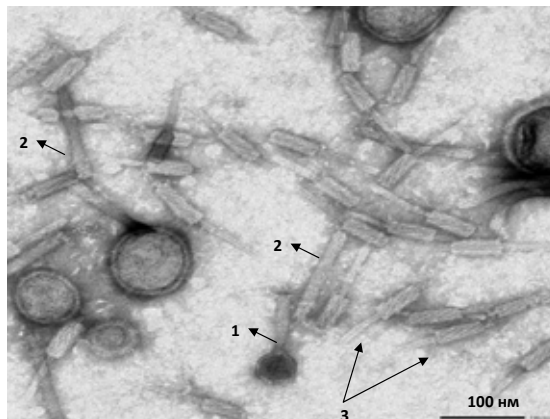
Объединенные начальные фракции (1/0,15-3/0,15) штамма ZM1 характеризовались частицами типа фаговых хвостовых отростков. Как правило, они преобладали в этих образцах и были представлены как сокращенной так и несокращенной (релаксированной) формами (рис. 4). Длина релаксированных отростков составила 147 нм. В сокращенном виде они имеют размер 137 нм. Это несовпадение линейных размеров отростков, очевидно, связано с существенным разрушением стержней после сокращения чехла [11].



**Рис. 4. Электроннограмма частиц, обнаруженных во фракциях 17-20/0,25 сумарных препаратах VLP штамма ZM1. Стрелками указаны: 1 – несокращенные хвостовые отростки; 2 – сокращены хвостовые отростки.**

В суммарном препарате пиковых фракций 11-16/0,25 VLP ZM1 хвостовые отростки также преобладали над всеми другими типами частиц. Особенность этих хвостовых отростков состоит в том, что несокращенные и сокращенные формы имеют одинаковую длину, которая составляет 144 нм.

В составе фракций 17/0,25 – 20/0,25 VLP указанного штамма были обнаружены целостные фаговые частицы. Длина хвостовых отростков полноценного фага в указанных фракциях составляет около 90 нм (рис. 5).



**Рис. 5. Микрофотография полноценного бактериофага ZF40 наряду с MCTV штамма ZM1, фракции 17-20/0,25.** Стрелками указаны: 1 – полноценный фаг, 2 – несокращенные хвостовые отростки; 3 – сокращены хвостовые отростки.

С помощью индикаторного штамма *E.carotovora* 5297 было показано, что этот фаг является гомологом фага ZF40, обнаруженного при работе со штаммом ZM1 в предыдущих исследованиях [12].

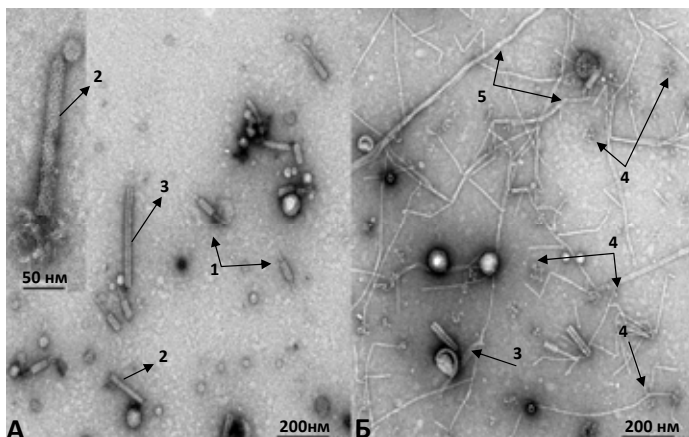
Хвостовые отростки не свойственны пиковым фракциям VLP ZM1, получаемых элюцией колонки 0,4 М NaCl. В этих фракциях наблюдали капсидные образования, а также, хотя и редко, полые чехлы, которые представляют собой оригинальные продукты самосборки [11]. Все эти структуры не соотносятся ни с одним из киллеров. Скорее всего данный препарат содержит низкомолекулярный CCTV, который не наблюдаются в электронном микроскопе и не осаждаются при ультрацентрифугировании, но эффективно убивает штаммы *E.carotovora*.

Таким образом, препараты частиц штамма Есс ZM1, полученные с помощью разделения на волокнистой ДЕАЕ-целлюлозе 23SS при электронной микроскопии характеризуются полиморфизмом и представлены, главным образом, фаговыми хвостовыми отростками.

Как было показано ранее бактериоцины типа фаговых хвостовых отростков из штамма 48А, являются достаточно нестабильными [11] и быстро разрушаются при получении и хранении. Тем не менее, они представляют большой интерес, так как кроме штаммов *E. carotovora* способны убивать лабораторные штаммы *E. coli* [13].

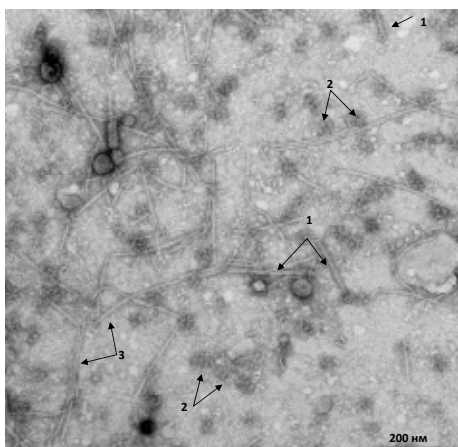
В препаратах 1-19 /0,15, так и во фракциях 11/0,25 – 24/0,25 общее число частиц невелико (рис. 6, А). Хвостовые отростки, длиной 148 нм, в подавляющем большинстве случаев, представлены сокращенными формами.

В то же время, во фракциях элюированных 0,4М NaCl, обнаруживаются базальные пластины и очень много полистержней (рис. 6; Б).



**Рис. 6.** Микрофотография частиц фаговой природы во фракциях 11-24/0,25 (А) и 13-22/0,4 (Б) VLP 48А. Стрелками указаны: 1 – сокращенные хвостовые отростки; 2 – несокращенные хвостовые отростки; 3 – пустые футляры; 4 – базальные пластины; 5 – пустые полифутляры.

Как ожидается из данных исследования киллерной активности VLP (смотрите выше) изогенные штаммы 48А и 48А-7/4b не должны отличаться по составу активных киллерных частиц. Тщательные EM-исследования подтвердили то, что элюаты, полученные 0,15 и 0,25M NaCl, содержат одинаковый набор частиц; редкие нативные хвостовые отростки и таковые с сокращенным чехлом, а также небольшое количество капсидных образований. Тем не менее, VLP 48А-7/4b в препарате фракций 16-24/0,4 существенно отличаются от такового штамма 48А. В первую очередь в нем был обнаружен избыток базальных пластин, диаметр которых составляет в среднем 60 нм. При этом суммарное количество полистержней остается неизменным и достаточно показательным для указанных препаратов VLP обоих штаммов. Кроме того, среди VLP Эсс 48А-7/4b мы впервые обнаружили хвостовые отростки фагов В морфотипа длиной 186 нм с оригинальной полярной частью, которая представляет собой округлое образование (рис. 7).



**Рис. 7.** Суммарный препарат базальных пластинок и полистержней, характерных для фракций 16-24/0,4 вирусоподобных частиц штамма Эсс 48А-7/4b. Стрелками указаны: 1 – несокращенные хвостовые отростки морфотипа В1; 2 – базальные пластины; 3 – длинные полистержни.

**Обсуждение.** Результаты проведенных исследований показывают, что, полилизогения *E. carotovora* характеризуется не только наличием дефектных фагов, но и обычными жизнеспособными вирусами. Неполные умеренные бактериофаги этой бактерии представляют собой набор отдельных VLP, которые формируют вирион: фаговые хвостовые отростки, капсидные образования и базальные пластины. Очевидно, что эти фаговые компоненты синтезируются отдельными ремнантными профагами, которые входят в состав бактериальной

хромосоми, поэтому их сборка в целостную частицу невозможна. Однако не исключено, что они синтезируются с особого генного кластера, который был обнаружен у *Pseudomonas aeruginosa* и который включает не только R- и F- бактериоцины, но также и колициноподобные бактериоцины S-типа [14].

Как показано в представленной работе, все типы бактериоцинов могут быть разделены на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой 23SS, т.е. весь спектр киллерной активности вирусоподобных частиц можно выразить через хроматографические профили. Профили активных VLP являются уникальными для того или иного штамма. Однако в случае изогенных штаммов они совпадают. Вследствие этих особенностей они могут характеризовать дефектную и истинную лизогению бактерий.

Электронномикроскопические исследования показали, что при одинаковых VLP-профилях двух изогенных штаммов количество и типы фаговых частиц могут существенно отличаться. В индуцированном лизате Есс 48А-7/4b нам удалось обнаружить не только избыток фаговых базальных пластинок, но и новый тип фаговых хвостовых отростков (Рис. 7). Так как в этом штамме других изменений кроме транспозиции Tn9 [7] в криптическую плазмиду рСА25 не произошло, можно предположить, что эта небольшая экстрахромосома существенно влияет на репликацию бактериальной ДНК и, соответственно, на общую динамику хромосомы *E. carotovora*. В связи с тем, что характер взаимоотношения различных репликонов в одной и той же микробной клетке сейчас начинает интенсивно изучаться, полученные в работе результаты могут рассматриваться как модельные для изучения сложных процессов на уровне бактериального нуклеоида.

С другой стороны, полилизогенные эрвинии представляют собой неисчерпаемый источник частиц разнообразной морфологии фагового происхождения и могут быть полезными для нанотехнологии.

Представленная работа частично профинансирована из фонда государственной научно-технической программы «Нанотехнологии и наноматериалы» и выполнялась в рамках научного проекта №0110U006114.

**Т.В. Іваниця<sup>2</sup>, К.Д. Крилова<sup>2</sup>, Ж.Ю. Сергєєва<sup>2</sup>, Ф.І. Товкач<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д03680, Україна

<sup>2</sup> Одеський державний університет ім. І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

## **ХРОМАТОГРАФІЧНІ ПРОФІЛІ ТА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ ВІРУСОПОДІБНИХ ЧАСТОК (VLP) *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *CAROTOVORA***

### **Резюме**

Неповні або дефектні бактеріофаги *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Есс) представляють собою набір окремих вірусоподібних часток (VLP), з яких формується віріон: фагові хвостові відростки, капсидні утворення і базальні пластинки. Крім того, індуковані лізати Есс можуть містити й інші типи VLP: окремі стержні й футляри, полістержні і поліфутляри. Для аналізу всього набору часток запропонований хроматографічний аналіз на волокнистій ДЕАЕ целюлозі 23 SS з подальшою електронною мікроскопією VLP. Встановлено, що хроматографічні профілі VLP, які здатні вбивати чутливі бактерії, є унікальними і консервативними ознаками полілізогенних штамів *E. carotovora*. Однак у випадку ізогенних штамів вони повністю збігаються. При використанні певного набору індикаторних штамів VLP-профілі можуть характеризувати не тільки дефектну, а й справжню лізогенію ервінії. Електронномікроскопічні дослідження показали, що при однакових VLP-профілях двох ізогенних штамів кількість і типи фагових часток можуть істотно відрізнятися. У індукованому лізаті Есс 48А-7/4b вдалося виявити не тільки надлишок фагових базальних пластин, а й новий тип фагових хвостових відростків. Так як в цьому штамі інших змін, крім транспозиції Tn9 в криптичну плазмиду рСА25, не відбулося, можна припустити, що ця невелика екстрахромосома істотно впливає на реплікацію бактеріальної ДНК і відповідно на загальну динаміку хромосоми *E. carotovora*.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, дефектна полілізогенія, вірусоподібні частки, хроматографія, електронна мікроскопія.

## CHROMATOGRAPHIC PROFILES AND ELECTRON MICROSCOPY OF VIRUS-LIKE PARTICLES (VLP) OF *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *CAROTOVORA*

### S u m m a r y

Incomplete or defective bacteriophages of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) are a collection of individual virus-like particles (VLP), which are formed of a virion: phage tails, capsid formations and the basal plates. In addition, Ecc-induced lysates may contain other types of VLP: individual cores and sheaths, polycores, and polysheaths. To analyze the entire set of particle chromatographic analysis on DEAE cellulose fiber 23 SS was proposed and was followed by electron microscopy of VLP. It was established, that the chromatographic profiles of VLP which are able to kill sensitive bacteria, have unique and conserved features of polylysogenic strains of *E. carotovora*. However, in the case of isogenic strains they are completely identical. While using a particular set of indicator strains, VLP-profiles can characterize not only defective, but also the true lysogeny of erwinia. Electron microscopy studies showed that at the same VLP-profiles of two isogenic strains, the number and types of phage particles may differ significantly. In the Ecc-induced lysate 48A-7/4b not only an excess of phage basal plates was found, but also a new type of phage tails. In this strain there are no other changes except for Tn9 transposition into a cryptic plasmid pCA25, therefore it may be assumed that this small extrachromosome affects significantly, the replication of bacterial DNA, and consequently the overall dynamics of the *E. carotovora* chromosome.

The paper is presented in Russian

**K e y w o r d s:** *Erwinia carotovora*, defective polylysogeny, virus-like particles, chromatography, and electron microscopy.

**T h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** Ivanytsia T.V., Mechnikov Odessa National University; 2 Dvoryanskaya St. Odessa, 65082, Ukraine.

1. Brüßow H., Canchaya C., Hardt W.D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2004. – 68 (3). – P. 560-602.
2. Matson E.G., Thompson M.G., Humphrey S.B., Zuerner R.L., Stanton T.B. Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira hyodysenteriae* // J. Bacteriol. – 2005. – 187(17). – P. 5885-92.
3. Паницина А. И., Товкач Ф. И. Генерализованная трансдукция плазмиды рKM101 умеренным бактериофагом ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2007. – 69, № 6. – С. 43-47.
4. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. - 2002. - 71, №3. - С.359-367.
5. Муквич Н.С., Товкач Ф.И. Изучение бактериоцинов *Erwinia carotovora* с помощью бактериальных индикаторов устойчивых к налидиксовой кислоте// Микробиология – 2003 – 72, №2. – С.199-205
6. Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Типирование фитопатогенных штаммов *Erwinia carotovora* на основе пектолитической активности и чувствительности к бактериоцинам (каротоворицинам) // Микробиология. – 1997. – 66, № 6. – С.823-828.
7. Сергеева Ж.Ю., Бурова Л.М., Товкач Ф.И. Внесение транспозона Tn9 в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Микробиол. журн. – 2006. – 68, №4. – С. 34 – 39.
8. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora*// Микробиология. – 1998. – 67, № 6. – С. 767–774.
9. Романиук Л.В., Муквич Н.С., Иванюца Т.В., Товкач Ф.И. Использование тиминовых ауксотрофных мутантов *Erwinia carotovora* для получения частиц дефектных бактериофагов// Микробиол. журн. – 2011. – 73, №4, С. 71–76.
10. Бурова Л.М., Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Природа криптической плазмиды рCA25 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48A// Микробиол. журн. – 2007. – 69, № 2. – С. 23–28.
11. Товкач Ф.И. Самосборка надмолекулярных структур in vitro после спонтанного разрушения каротоворицинов // Микробиология. – 2002. – 71, №4. – С. 467–474



12. Товкач Ф.И. Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, №1. – С. 75–81.
13. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – **67**, № 6. – С. 767–774.
14. Nakayama K., Takashima K., Ishihara H., Shinomiya T., Kageyama M., Kanaya S., Ohnishi M., Murata T., Mori H., Hayashi T. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage//Mol. Microbiol. – 2000. – **38**, N2. – P. 213–231.

Отримано 20.10.2010