

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММА ENTEROBACTER SPP И СПЕЦИФИЧНОГО ЕМУ ФАГА E7 МЕТОДОМ СРАВНИТЕЛЬНОГО ГЕНОМНОГО И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Сулдына Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017. г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 89374545651

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

Ключевые слова: *Enterobacter*, бактериофаги, секвенирование, энтеробактер, биологические свойства, геном, филогенетическое дерево.

В статье представлены результаты исследований по сравнительному геномному и филогенетическому анализу штамма *Enterobacter spp* и гомологичного ему фагу E7 серии УГСХА. Штаммы фага и бактерии выделены из объектов окружающей среды и санитарного надзора и селекционированы авторами в 2017 году. Бактериальный штамм *Enterobacter* идентифицирован нами по биологическим свойствам как *Enterobacter cloacae*. Дана характеристика бактериофага по основным биологическим свойствам. Результаты сравнительного анализа рибосомальной последовательности генов 16S рРНК (1313 нуклеотидов) штамма *Enterobacter spp* с известными последовательностями генов 16S рРНК в базе данных GeneBank с помощью программы BLASTN показали родство выделенного штамма со штаммом *Enterobacter cloacae strain AR*, полный сиквенс которого представлен в базе данных NCBI. Используя полученные данные, построили бескорневое филогенетическое дерево штамма *Enterobacter cloacae* 1. Сравнение сиквенса фага E7 серии УГСХА специфичного в отношении *Enterobacter spp* проводили на основании последовательности гена терминазы (793 нуклеотидов) и ДНК полимеразы (201 нуклеотид) с известными последовательностями генов в базе данных GeneBank в программе BLASTN. Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генома изучаемого фага показал, что бактериофаг E7 имеет родство с фагом *Cronobacter phage vB*. На основании полученных данных были построены бескорневые филогенетические деревья по нуклеотидным последовательностям генов TERS и ДНК полимеразы фага E7 и гомологичных фагов, представленных в базе данных NCBI.

Исследования проводятся при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект «Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» №16-44-732038.

Введение

В последние годы все больше групп ученых по всему миру не только выделяют новые вирулентные бактериофаги и изучают их биологические свойства, но и проводят их сравнительный геномный и филогенетический анализы. Эта информация вносит значительный вклад в фундаментальные знания о природе бактериофагов и их разнообразии, а также имеет не малое прикладное значение при оценке возможности использования фагов в создании терапевтических препаратов.

Так, корейские ученые, во главе с Cha, Kyoungеun изучали воздействие коктейля, содержащего два новых изолированных фага *Acinetobacter baumannii* на мышей. Изученные ими штаммы фагов (в т.ч. и их геном), по данным автором, могут быть расценены как потенциально перспективные для создания терапев-

тического препарата при лечении инфекций, вызываемых *Acinetobacter baumannii* [1].

Группа польско-канадских исследователей [2] изучила последовательность, организацию генома и протеомику термофильного бактериофага TP-84 лизирующего *Geobacillus stearothermophilus*. По результатам исследований ученые предложили Международному комитету по таксономии вирусов классифицировать его как представителя нового рода *Trp84virus*.

Индийские ученые [3] Sritha, K. S., Bhat, Sarita G. изучили несколько сальмонеллезных бактериофагов. Наибольшее внимание они уделили фагу *Stp1*, который эффективно поражае серовары *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium*. Данное исследование не только дало представление о характеристиках генома фага, но также информацию о белках, кодиру-

емых бактериофагами, поэтому способствовало пониманию разнообразия фагов. Анализ последовательности также доказал отсутствие вирулентности и связанных с лизогеном генов, которые только подтвердили перспективность фага *Stp1* как терапевтического агента против сальмонеллезной инфекции.

Американцы Halter, Mathew C. и Zahn, James A. [4] охарактеризовали новый литический бактериофаг *DTL*, который способен к быстрой литической инфекции штамма *K12 Escherichia coli*, используемого для коммерческого производства 1,3-пропандиола (PDO). Геном бактериофага был секвенирован и аннотирован.

Американские ученые [5] изучали геномы шигеллезных бактериофагов, изолированных после вспышки дизентерии в 2016 году в Мичигане. Исследователи представили всесторонний анализ диапазонов, геномов и структур этих фагов, выявляющих размеры генома и свойства капсида, которые оказались довольно редкими по сравнению с ранее описанными фагами.

Mantynen, Sari, со своими коллегами из Финляндии [6] из образцов окружающей среды выделили большое количество dsRNA-фагов. Шесть из них (*Pseudomonas phages phi8, phi12, phi13, phi2954, phiNN* и *phiYY*) были полностью секвенированы. Все эти фаги были активны в отношении бактерий *Pseudomonas*, в первую очередь растительного патогена *Pseudomonas syringae*. Авторы описывают изрядное генетическое и структурное сходство с *Pseudomonas phage phi6* и предлагают, чтобы эти вирусы были включены в род цистовируса (и, следовательно, в семейство *Cystoviridae*). До этого времени *Cystoviridae* - семейство бактериальных вирусов (бактериофагов) с трехсегментным геномом dsRNA включало в себя один род цистовирус, который имел только один признанный вирус - *Pseudomonas phi6*.

Иранские ученые [7] изучили новый вирулентный шигеллезный бактериофаг *vB_SsoS-ISF002*, активный в отношении различных изолятов как *Shigella sonnei*, так и *Shigella flexneri*. Согласно сравнительному геномному и филогенетическому анализу определили его как *T1* подобный фаг. Кроме того, ученые отметили, что *vB_SsoS-ISF002* фаг имеет потенциальные перспективы в качестве терапевтического агента против шигеллеза.

В связи с этим целью наших исследований было проведение сравнительного геномного и филогенетического анализа штамма *Enterobacter spp* и гомологичного ему фага *E7* серии УГСХА.

Объекты и методы исследований

В работе использовали бактериальный

штамм энтеробактера, идентифицированного нами по биологическим свойствам [8] как *Enterobacter cloacae* и гомологичный штамму бактериофаг *E7*. Штаммы фага и бактерии выделены авторами из объектов окружающей среды и санитарного надзора в 2017 году.

Фаг *E7* серии УГСХА, выделенный из объектов внешней среды, обладает следующими биологическими характеристиками - бляшкообразующие единицы округлой формы, 3-4 мм в диаметре, прозрачные без зон неполного лизиса. По Грациа литическая активность бактериофага составляет $2 \pm 0,2 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, по Аппельману 10^{10} . Диапазон литического действия изучаемого фага равен 81%, что было установлено на 21 штамме бактерий рода *Enterobacter*. Данный фаг специфичен по отношению к бактериям *Enterobacter spp*, обладает устойчивостью к воздействию температуры до 65 °С и трихлорметану в течение 40 минут в соотношении 1:10 [9].

Материалы: смесь для ПЦР («Интерлабсервис»), смесь праймеров (НПФ «Литех»), агароза («Хеликон»); трис-HCl, («Amresco»), набор для очистки ДНК от агарозного геля «QIAquick Gel Extraction», (QIAGEN), набор для секвенирования, набор для выделения ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-В», («Интерлабсервис»), микроцентрифуга (Eppendorf Minispin), смеситель «Vortex» (Biosan), твердотельный термостат (Термит, ДНК Технология), амплификатор ДТ-96 (ДНК технологии), фильтрующие насадки Миллекс 0,22 мкм (PVDF) (Millipore), генетический анализатор («Applied Biosystems 3130XL», Applied Biosystems), набор компонентов для очистки сиквенсовой смеси «BigDye Terminator» (Applied Biosystem).

Для выделения культуральной ДНК использовали биомассу исследуемого штамма *Enterobacter*. Для выделения фаговой ДНК - фаголизат.

Для определения нуклеотидных последовательностей использовали метод нуклеотидного секвенирования. Нуклеотидное секвенирование проводили с использованием геноспецифических праймеров, а также уникальных подобранных праймеров.

Смесь после сиквенсовой реакции очищали с использованием набора «BigDye X Terminator» («Applied Biosystems») согласно инструкции изготовителя.

Для видовой идентификации штаммов бактерий исследуемые последовательности ДНК анализировали с гомологичными известными последовательностями генов 16S рПНК в базе данных GeneBank с помощью программы BLASTN.

Идентичность последовательностей уста-

навливали на основе статистической значимости совпадений последовательностей. Дополнительный анализ последовательностей проводили с помощью выравнивания, используя программу ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>).

Результаты исследований

Для видовой идентификации штамма *Enterobacter cloacae* 1 получили последовательность 1313 нуклеотидов:

GCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGT
ATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAC
GGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACC
TTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT
AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACC
TTGTCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGAGGCGGTCTGTCAAGTCGGAT
GTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACTGCATTCGAAACTGGC
AGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGTGGCGAAGGCGG
CCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGT
CGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGAGCTAAC
CGCTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC
TCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCC
AGAGAAGTCTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAG
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGG
GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCG
GTTAGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAG
GGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCT
CGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATT
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
TGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGGCTTGT

Исследуемые последовательности ДНК анализировали с гомологичными известными последовательностями генов 16S рРНК в базе данных GeneBank с помощью программы BLASTN (табл. 1).

Установлено, что исследуемый штамм *Enterobacter cloacae* 1 имеет 99% гомологию со штаммом *Enterobacter cloacae* strain AR, полный сиквенс которого представлен в базе данных NCBI.

Используя полученные данные, построили бескорневое филогенетическое дерево по нуклеотидной последовательности исследуемого штамма *Enterobacter cloacae* 1 и гомологичных штаммов, представленных в базе данных NCBI (рис. 1)

Сравнение сиквенса фага E7 серии УГСХА

специфичного в отношении *Enterobacter spp* проводили на основании последовательности гена терминазы и ДНК полимеразы с известными последовательностями генов в базе данных GeneBank в программе BLASTN. Результаты представлены в таблице 2 и 3.

Для биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей фага E7 серии УГСХА по гену терминазы получили фрагмент генома в 793 нуклеотида:

TTTTTGTTAAGGTCATGAGCGCTTGTAAAGTTCATGAA
CCCAGACATATAAGGAACCGGTTTAAACGGCGCTTGATGTGCT
TACAGAGCGATGGAATGGGGAATATGCTCCAGTCTTCCTTCGT
CTTCGGGTTTTCAATACTCCCTTGACCGTCGATGATACCCAGC
TTGTAAGCCGTCATTCAGTCCAGGGCTTTTTCAGTAGGCGAATC
ATTCGCACACTGTAGGTTAAATCCATGTTTTTGATTAATTGATCGC
TCATAGTCTTACTATTGTGAAAGTGAAAAGTTTTGCGCGGG
TTCTGGCTCCGGTTCGGGGAATTCATACAGACAATTCACACAT
CGGTTTCACGCCTTCCATTCTCCAGATAATATCCGGTATCAATGC

Таблица 1

Сравнение сиквенса исследуемого штамма *Enterobacter cloacae* 1 с гомологичными известными последовательностями генов 16S рРНК в базе данных GeneBank с помощью программы BLASTN

Ближайший гомолог по данным BLASTN		
Id в GenBank	Вид, штамм	% идентичных нуклеотидов
CP021902.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain AR_0136, complete genome	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)
CP021776.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain AR_0053, complete genome	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)
MF144477.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain FQ30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)
KY672864.1	<i>Enterobacter sp.</i> strain BAB-6042 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)
KX940805.1	<i>Uncultured Escherichia</i> sp. clone KEV16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)
CP018814.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain AR_0002, complete genome	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)
KX156583.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain 41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)
KT825923.1	<i>Enterobacter sp.</i> NCX14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)
KT825922.1	<i>Enterobacter sp.</i> MCX5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Identities = 1312/1313 (99%), Gaps = 1/1313(0%)



Рис. 1 - Построение бескорневого филогенетического дерева по нуклеотидной последовательности гена 16SpPHK *Enterobacter cloacae* 1 и гомологичных штаммов, представленных в базе данных NCBI

Таблица 2

Сравнение сиквенса фага E7 серии УГСХА (ген терминазы) с гомологичными известными последовательностями генов в базе данных GeneBank с помощью программы BLASTN

Ближайший гомолог по данным BLASTN		
Id в GenBank	Вид, штамм	% идентичных нуклеотидов
KX443552.1	Cronobacter phage vB_CsaM_LeE, complete genome	Identities = 765/772 (99%), Gaps = 0/772 (0%)
KX431560.1	Cronobacter phage vB_CsaM_LeN, complete genome	Identities = 765/772 (99%), Gaps = 0/772 (0%)
KX431559.1	Cronobacter phage vB_CsaM_LeB, complete genome	Identities = 765/772 (99%), Gaps = 0/772 (0%)
KT381880.1	Citrobacter phage Margaery, complete genome	Identities = 759/772 (98%), Gaps = 0/772 (0%)
HM134276.1	Enterobacteria phage RB16, complete genome	Identities = 710/764 (93%), Gaps = 2/764 (0%)
KC801932.2	Escherichia phage Lw1, complete genome	Identities = 697/765 (91%), Gaps = 4/765 (0%)
KM236237.1	Citrobacter phage Miller, complete genome	Identities = 682/758 (90%), Gaps = 7/758 (0%)
HE858210.2	Enterobacteria phage RB43, isolate RB43-GVA complete genome	Identities = 682/758 (90%), Gaps = 7/758 (0%)
HE981739.1	Enterobacteria phage RB43, isolate RB43-GVA orf057::gfp complete genome	Identities = 682/758 (90%), Gaps = 7/758 (0%)
AY967407.1	Enterobacteria phage RB43, complete genome	Identities = 682/758 (90%), Gaps = 7/758 (0%)

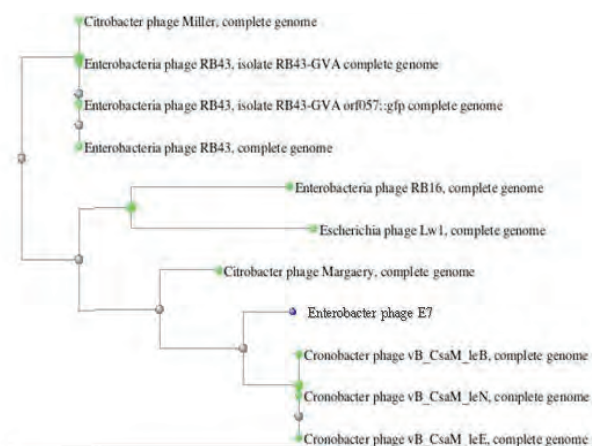


Рис. 2 - Построение бескорневого филогенетического дерева по нуклеотидной последовательности гена терминазы фага E7 серии УГСХА и других фагов, представленных в базе данных NCBI

CGCAACCTGGTTGCATTTCAAGGCCAGTTTCATCAAGAACTTTT
TGCATTTTCGATGTTGTCGTTGATTCGTCCTGTTGGAAATAACGCCG
TCCAGAGTAACGAAAATTCGCGGACATCTGCGGGAGAATGAACG
TACCCGCACGGGCAATTTGTGAAGCAGTTCATCACTTTGTATTC
AAATTCGCGCCCGTATACTTACCSTTAAATTTGGATGTCTTATCT
TGCCGAAAGGTGGATTGCTGATCGCCATATCAAAACAGAGTATCAA
ACTCCGTCGTTAACGCGTCTGCGTTAATCCAGGTCGTTCCGGTAC
GATACGTTACCCAACCTATAGTATGTATGGTTTAACTSAACACAG
ACGATTTACGCGGTTCTTCGTTAC

При сравнении нуклеотидной последовательности гена TERS исследуемого фага с нуклеотидными последовательностями этого гена других фагов, полный сиквэнс которых представлен в базе данных NCBI, установили, что фаг E7 серии УГСХА имеет 99% гомологию с фагом *Cronobacter phage vB* и 98% гомологию со штаммом *Citrobacter phage Margaery*.

Опираясь на полученные данные, построили бескорневое филогенетическое дерево по нуклеотидной последовательности гена TERS фага E7 серии УГСХА и других фагов, представленных в базе данных NCBI (рис. 2)

Для анализа нуклеотидных последовательностей фага E7 серии УГСХА по гену ДНК полимеразы (NESTOR) получили фрагмент генома размером 201 нуклеотид:

TCGAGAGATACACCAACGAATACCATCAGGACTTTCCCC
GTGCTGTGCATAAATACTGTGAAAATGCTTTTGTCTCTTCGATCTGT
TCGATAGAAGACTTATCACGGACTGGAACATATTTCTTACGGTAA
GTACGGCTCATAGTGTCTCTTTGTTTGTCTGAATACACSTTAAC
AGTTCAGTCCCACAGTAAAGTTGCT

Сравнение нуклеотидной последовательности гена ДНК полимеразы исследуемого фага с нуклеотидными последовательностями гена ДНК полимеразы других фагов, полный сиквэнс которых представлен в базе данных NCBI, показало, что фаг E7 серии УГСХА имеет 97% гомо-

логию по этому фрагменту с фагом *Citrobacter phage Margaery* и 96% гомологию с фагами группы *Cronobacter phage vB*.

Бескорневое филогенетическое дерево по нуклеотидной последовательности ДНК полимеразы фага E7 серии УГСХА представлено на рис. 3.

Выводы

Результаты сравнительного анализа рибосомальной последовательности генов 16S рРНК (1313 нуклеотидов) исследуемого бактериального штамма с известными последовательностями генов 16S рРНК в базе данных GeneBank с помощью программы BLASTN показали, что исследуемый штамм *Enterobacter cloacae 1* имеет 99% гомологию со штаммом *Enterobacter cloacae strain AR*, полный сиквенс которого представлен в базе данных NCBI.

Сравнение сиквенса фага E7 серии УГСХА специфичного в отношении *Enterobacter spp* проводили на основании последовательности гена терминазы (793 нуклеотидов) и ДНК полимеразы (201 нуклеотид) с известными последовательностями генов аннотированных в базе данных GeneBank. Установлено, что по гену TERS фаг E7 серии УГСХА имеет 99% гомологию со штаммом *Cronobacter phage vB* и 98% гомологию с фагом *Citrobacter phage Margaery*.

При сравнении нуклеотидной последовательности гена ДНК полимеразы исследуемого фага с нуклеотидными последовательностями гена ДНК полимеразы других фагов, полный сиквенс которых представлен в базе данных NCBI, установлено, что фаг E7 серии УГСХА имеет 97% гомологию по этому фрагменту с фагом *Citrobacter phage Margaery* и 96% гомологию с фагами группы *Cronobacter phage vB*.

На основании полученных результатов были построены бескорневые филогенетические деревья для исследуемого бактериального штамма *Enterobacter cloacae 1* по участку последовательности генов 16S рРНК и для фага E7 серии УГСХА по нуклеотидным последовательностям генов TERS и ДНК полимеразы.

Полученные данные позволяют утверждать, что выделенный авторами бактериальный штамм *Enterobacter cloacae 1* действительно принадлежит к виду *Enterobacter cloacae*, а бактериофаг E7 серии УГСХА имеет вирулентную природу как родственные фаги, что позволяет рекомендовать бактериофаг его для конструирования терапевтического биопрепарата.

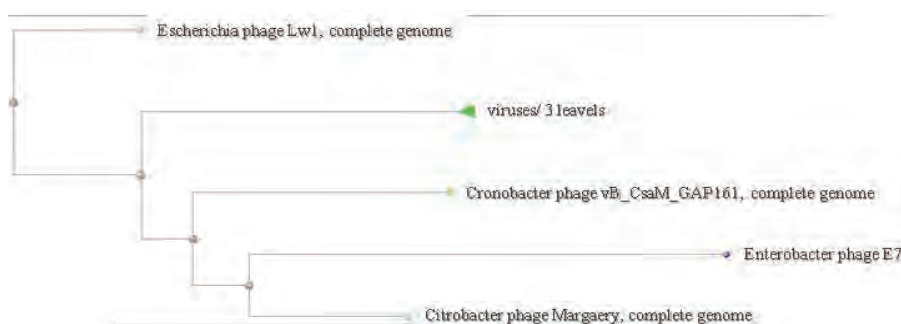


Рис. 3 - Построение бескорневого филогенетического дерева по нуклеотидной последовательности ДНК полимеразы фага E7 серии УГСХА и других фагов, представленных в базе данных NCBI

Таблица 3

Сравнение сиквенса фага E7 серии УГСХА (ген ДНК полимеразы) с известными аннотированными генами фагов, представленных в базе данных GeneBank с помощью программы BLASTN

Ближайший гомолог по данным BLASTN		
Id в GenBank	Id в GenBank	Id в GenBank
KT381880.1	Citrobacter phage Margaery, complete genome	Identities = 173/179 (97%), Gaps = 0/179 (0%)
JN882287.1	Cronobacter phage vB_CsaM_GAP161, complete genome	Identities = 174/182 (96%), Gaps = 0/182 (0%)
KX443552.1	Cronobacter phage vB_CsaM_leE, complete genome	Identities = 171/179 (96%), Gaps = 0/179 (0%)
KX431560.1	Cronobacter phage vB_CsaM_leN, complete genome	Identities = 171/179 (96%), Gaps = 0/179 (0%)
KX431559.1	Cronobacter phage vB_CsaM_leB, complete genome	Identities = 171/179 (96%), Gaps = 0/179 (0%)
KC801932.2	Escherichia phage Lw1, complete genome	Identities = 162/175 (93%), Gaps = 2/175 (2%)

Библиографический список

1. Characterization of two novel bacteriophages infecting multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* and evaluation of their therapeutic efficacy in vivo / Cha K, Oh HK, Jang JY, Jo Y, Kim WK, Ha GU, Ko KS, Myung H// Front. Microbiol. – 2018. - 9:696. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00696.
2. Sequence, genome organization, annotation and proteomics of the thermophilic, 47.7-kb *Geobacillus stearothermophilus* bacteriophage TP-84 and its classification in the new T_p84virus genus / P.M. Skowron, A.M. Kropinski, J. Zebrowska, L. Janus, K. Szemiako, E. Czajkowska et al. // PLoS ONE 13(4):e0195449. DOI: 10.1371/journal.pone.0195449.

3. Sritha, K.S. Genomics of Salmonella phage Φ Stp1: candidate bacteriophage for biocontrol / K.S. Sritha, S.G. Bhat // *Virus Genes*. – 2018. - Vol. 54. P. 311–318. DOI: 10.1007/s11262-018-1538-3.

4. Halter, M.C. Characterization of a novel bacteriophage from an industrial *Escherichia coli* fermentation process and elimination of virulence using a heterologous CRISPR-Cas9 system / M.C. Halter, J.A. Zahn // *J Ind Microbiol Biotechnol*. - 2018. – Vol. – 45 P. 153–163. DOI: 10.1007/s10295-018-2015-7.

5. Shigella phages isolated during a dysentery outbreak reveal uncommon structures and broad species diversity/ S.M. Doore, J.R. Schrad, W.F. Dean, J. Dover, K.N. Parent // *J. Virol*. – 2018 – Vol. 92. - P. 02117-17 DOI: 10.1128/JVI.02117-17

6. Recognition of six additional cystoviruses: *Pseudomonas virus phi6* is no longer the sole species of the family Cystoviridae / S. Mäntynen, L.R. Sundberg, M.M. Poranen // *Arch Virol*.-2018 - Vol. 163. - P. 1117 - 1124. DOI: 10.1007/s00705-017-3679-4

7. Isolation, characterization and genomic analysis of a novel lytic bacteriophage vB_SsoS-ISF002 infecting *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* / K. Shahin, M. Bouzari, R. Wang // *Journal of medical microbiol-*

ogy. – 2018. - Vol. 67(3). - P. 376-386. DOI: 10.1099/jmm.0.000683.

8. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. – Ульяновск: Копиринг, 2004. – 130 с.

9. Бактериофаги бактерий *Enterobacter* и их основные биологические характеристики / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Богданов И.И. // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2017. - № 4 (40). – С. 94-98.

10. Molecular-genetic characteristics of bacteriophage *Bacillus cereus* FBC - 28 UGSHA / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, S.N. Zolotukhin, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, A.V. Dozorov, V.A. Isaichev, I.L. Obukhov, B.I. Shmorgun // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. - 2018. - Т. 9. - № 4. - С. 345-354.

11. Molecular-genetic characteristics of strains of *Proteus* bacteriophages / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, S.N. Zolotukhin, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, A.V. Dozorov, V.A. Isaichev, I.L. Obukhov // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. - 2018. - Т. 9. - № 4. - С. 200-206.

IDENTIFICATION OF ENTEROBACTER SPP STRAIN AND SPECIFIC TO IT E7 PHAGE BY COMPARATIVE GENOME AND PHYLOGENETIC ANALYSIS

Suldina E.V., Vasilev D.A., Feoktistova N.A.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017. Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard, 1; 89374545651

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

Key words: Enterobacter, bacteriophages, sequencing, PCR, enterobacter, biological properties, genome.

The article presents results of studies on the comparative genome and phylogenetic analysis of the *Enterobacter* spp strain and its homologous phage E7 of the UGSKhA series. The phage strains and bacteria were isolated from environmental and sanitary objects and selected by the authors in 2017. The bacterial strain *Enterobacter* was identified by our biological properties as *Enterobacter cloacae*. A characteristic of bacteriophage on the basic biological properties was given. The results of a comparative analysis of ribosomal sequence of the 16S rRNA genes (1313 nucleotides) of *Enterobacter* spp strain with known 16S rRNA gene sequences in the GeneBank database using the BLASTN program showed identity of the isolated strain with the *Enterobacter cloacae* strain AR complete sequence of which is presented in the NCBI database. Using the data obtained, a rootless phylogenetic tree of *Enterobacter cloacae* 1 strain was constructed. Comparison of the sequence of UGSKhA phage E7 specific for *Enterobacter* spp was performed based on the terminase gene sequence (793 nucleotides) and DNA polymerase (201 nucleotides) with known gene sequences in the GeneBank database in BLASTN program. Bioinformatics analysis of the nucleotide sequences of the genome fragments of the phage under study showed that bacteriophage E7 has an identity for the phage *Cronobacter* phage vB. Based on the data obtained, rootless phylogenetic trees were constructed from the nucleotide sequences of the TERS genes and the DNA polymerase of phage E7 and homologous phages presented in the NCBI database.

Bibliography

1. Characterization of two novel bacteriophages infecting multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* and evaluation of their therapeutic efficacy in vivo / Cha K, Oh HK, Jang JY, Jo Y, Kim WK, Ha GU, Ko KS, Myung H // *Front. Microbiol*. – 2018. - 9:696. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00696.

2. Sequence, genome organization, annotation and proteomics of the thermophilic, 47.7-kb *Geobacillus stearothermophilus* bacteriophage TP-84 and its classification in the new T ϕ 84virus genus / P.M. Skowron, A.M. Kropinski, J. Zebrowska, L. Janus, K. Szemiako, E. Czajkowska et al. // *PLoS ONE* 13(4):e0195449. DOI: 10.1371/journal.pone.0195449.

3. Sritha, K.S. Genomics of Salmonella phage Φ Stp1: candidate bacteriophage for biocontrol / K.S. Sritha, S.G. Bhat // *Virus Genes*. – 2018. - Vol. 54. P. 311–318. DOI: 10.1007/s11262-018-1538-3.

4. Halter, M.C. Characterization of a novel bacteriophage from an industrial *Escherichia coli* fermentation process and elimination of virulence using a heterologous CRISPR-Cas9 system / M.C. Halter, J.A. Zahn // *J Ind Microbiol Biotechnol*. - 2018. – Vol. – 45 P. 153–163. DOI: 10.1007/s10295-018-2015-7.

5. *Shigella* phages isolated during a dysentery outbreak reveal uncommon structures and broad species diversity/ S.M. Doore, J.R. Schrad, W.F. Dean, J. Dover, K.N. Parent // *J. Virol*. – 2018 – Vol. 92. - P. 02117-17 DOI: 10.1128/JVI.02117-17

6. Recognition of six additional cystoviruses: *Pseudomonas virus phi6* is no longer the sole species of the family Cystoviridae / S. Mäntynen, L.R. Sundberg, M.M. Poranen // *Arch Virol*.-2018 - Vol. 163. - P. 1117 - 1124. DOI: 10.1007/s00705-017-3679-4

7. Isolation, characterization and genomic analysis of a novel lytic bacteriophage vB_SsoS-ISF002 infecting *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* / K. Shahin, M. Bouzari, R. Wang // *Journal of medical microbiology*. – 2018. - Vol. 67(3). - P. 376-386. DOI: 10.1099/jmm.0.000683.

8. Золотухин, С.Н. Little-studied enterobacteria and their role in the pathology of animals / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk: Copiring, 2004. - 130 p.

9. Bacteriophages of *Enterobacter* bacteria and their main biological characteristics / E.V. Suldina, D.A. Vasilev, S.N. Zolotukhin, Bogdanov I.I. // *Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2017. - № 4 (40). - P. 94-98.

10. Molecular-genetic characteristics of bacteriophage *Bacillus cereus* FBC - 28 UGSKhA / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, S.N. Zolotukhin, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, A.V. Dozorov, V.A. Isaichev, I.L. Obukhov, B.I. Shmorgun // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. - 2018. - V. 9. - № 4. - P. 345-354.

11. Molecular-genetic characteristics of strains of *Proteus* bacteriophages / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilev, A.V. Mastilenko, E.V. Suldina, S.N. Zolotukhin, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, A.V. Dozorov, V.A. Isaichev, I.L. Obukhov // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. - 2018. - V. 9. - № 4. - P. 200-206.