

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ *ENTEROBACTER SPP.* ДЛЯ ОЦЕНКИ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СОСТАВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО БИОПРЕПАРАТА

Сулдина 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»

Масиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8937454565;

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

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

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

В статье представлены результаты исследований по выделению и изучению биологических и генетических характеристик бактериофагов бактерий рода *Enterobacter*. Охарактеризованы изоляты бактериофагов, специфичных к *Enterobacter spp.* по основным биологическим свойствам. Дана молекулярно-генетическая характеристика отобранному для дальнейших исследований энтеробактерному фагу E4. На основании полученных секвенсовых данных изучения генома составлена карта его линейной ДНК. Определены продукты экспрессии генов фага E4 в соответствии с известными аналогами. Разработана система молекулярно-генетической индикации автономных генетических элементов в геноме бактериофага, активного в отношении *Enterobacter*, с использованием ПЦР. Определена уникальность гена-кандидата, и выбран фрагмент гена *toxin RelE*, кодирующий локус гена инвазивного белка. Результаты экспериментальных исследований выявления специфического фрагмента гена *RelE* культур *Enterobacter spp.* с разработанными системами олигонуклеотидов в геноме энтеробактерного бактериофага E4 подтвердили вирулентную природу отобранного бактериофага и отсутствие локусов патогенности. Полученные данные позволяют рекомендовать бактериофаг E4, специфичный к бактериям рода *Enterobacter*, для конструирования терапевтического биопрепарата с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных и птицы.

Введение

Энтеробактер (*Enterobacter*) – род грамотрицательных палочкообразных перитрихальных споронеобразующих бактерий, факультативных анаэробов.

Энтеробактеры широко распространены в природе, бактерии выделяют из воды, сточных вод, растений, пищевого сырья животного и растительного происхождения и готовых к употреблению продуктов. Кроме этого, бактерии рода *Enterobacter* являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и животных [1].

Однако представители этого рода относятся к условно-патогенным микроорганизмам и способны вызывать заболевания человека и животных при определенных условиях.

Одной из глобальных проблем современной ветеринарии и медицины является вопрос развития устойчивости бактерий к химическим дезинфектантам и химиотерапевтическим препаратам.

Многими исследователями отмечена чрезвычайная устойчивость бактерий рода *Enterobacter* к применяемым в практике дезинфектантам. Их находили при контроле стерильности рук у персонала операционной [2].

Согласно литературным данным все энтеробактеры отличаются высокой устойчивостью к антибиотикам: амоксицилину, амоксициллин-клавулановой кислоте, цефалотину, мезлоцилину, цефатоксиму, тобрамицину, гентамицину и др. [3-4].

Изучение С.Н. Золотухиным [1] чувстви-

тельности штаммов энтеробактера, выделенных от больных диареей поросят-сосунов, к 10 антибиотикам (пеницилину, стрептомицину, гентамицину, эритромицину, левомицетину, оксациллину, линкомицину, ампициллину, полимиксину М, тетрациклину) показало, что все культуры были чувствительны только к гентамицину.

При тестировании чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, выделенных из продуктов животного происхождения, Ю.А. Короткевич [5] с соавторами установили, что более 30 % исследуемых штаммов *Enterobacter spp* обладали мультирезистентностью.

Н.Р. Ефимочкина [6] с соавторами опубликовали данные об исследованиях антибиотикочувствительности 17 штаммов бактерий, выделенных из молочных продуктов. Ученые установили, что два штамма бактерий рода *Enterobacter* были устойчивы ко всем тетрациклиновым антибиотикам, ампициллину, и один из них – к хлорамфениколу.

Исследования, проведенные Шипицыной И.В. [7] с соавторами на 18 клинических штаммах бактерий *E. cloacae*, выделенных из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления во время операции у пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей, показали наличие 100 % устойчивости их к ампициллину, цефтриаксону, амоксиклаву. Среди 16 используемых антибактериальных препаратов наибольшей эффективностью в отношении штаммов *E. cloacae*, по мнению ученых, обладали карбопенемы - имипенем и меропенем.

A. Hernandez, R. Mellado [8] определили, что рост в присутствии ванадия приводит к фенотипу множественной лекарственной устойчивости штаммов. Имеются данные о резистентности штаммов *E. aerogenes* и *E. cloacae* к токсичности кадмия, хрома, соединениям мышьяка [9].

Чувствительность к солево-му стрессу у штаммов *Enterobacter* изучали R. Rai, G. Kieder [10]. Штаммы показывали оптимальный рост при 0.5–1 % NaCl на минимально безазотной среде с глюкозой в течение 28 ч инкубации, хотя лучший рост наблюдается при 3–2 % NaCl спустя 52 и 100 ч инкубации, по сравнению с 28-часовой культурой.

В.И. Сергеевнин [11] с соавторами экспериментально установили, что штамм *E. cloacae*, обладающий неполной чувствительностью к дезинфектантам группы четвертично-аммониевых соединений, приобретает устойчивость к препаратам в концентрации, являющейся по отношению к эталонным штаммам микроорганизмов

бактерицидной, после 2–12-го воздействия.

При изучении толерантности энтеробактерий к хлорсодержащим биоцидным средствам Н.Р. Ефимочкина [12] с соавторами установили, что только концентрации 200 и 150 мг/дм³ активного хлора подавляли рост бактерий рода *Enterobacter* либо значительно ингибировали рост штаммов на 3,5–4,7 логарифмического порядка.

В связи с такой обширной распространённостью энтеробактеров в окружающей среде и их значительной устойчивостью к антимикробным препаратам и химическим дезинфектантам, **целью** наших исследований было выделение и изучение биологических и генетических характеристик бактериофагов бактерий рода *Enterobacter* для оценки возможностей их использования в составе терапевтического био-препарата.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать новые изоляты бактериофагов *Enterobacter* по основным биологическим свойствам.

2. Дать молекулярно-генетическую характеристику отобранному для дальнейших исследований энтеробактерному фагу.

3. Подтвердить вирулентную природу отобранного бактериофага и установить отсутствие в его геноме локусов патогенности.

Объекты и методы исследований

В работе было использовано 7 изолятов бактериофагов, специфичных к бактериям рода *Enterobacter*: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, выделенных и селекционированных авторами.

Бактерии рода *Enterobacter* - 21 штамм (*E. dissolvens* – 10, *E. cloacae* - 11).

Бактерии гетерологичных родов - 90 штаммов бактерий *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Listeria*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ и выделенные нами из объектов окружающей среды и санитарного надзора. Культуры бактерий обладали типичными для данных видов культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами.

Работа с бактериофагами проводилась по методикам, ранее апробированным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ [13–14].

Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов использовали полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов второго поколения

(Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Каждый штамм бактериофага был секвенирован троекратно. Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геномы бактериофагов с высокой достоверностью.

В исследованиях были использованы библиотеки баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей).

Для оптимизации протокола полимеразной цепной реакции использовали электрофорез.

Результаты исследований

Из более 50 проб объектов окружающей среды нами было выделено и селекционировано 7 бактериофагов бактерий *Enterobacter*.

Установлено, что по морфологии негативных колоний полученные фаги можно разделить на два вида. К первому относятся изоляты E1, E3, E6 с округлыми, прозрачными, без зон неполного лизиса колониями, диаметром до 1 мм. Ко второму виду отнесли круглые, прозрачные, без зон неполного лизиса, до 3-4 мм в диаметре колонии, образуемые фагами E2, E4, E5, E7. Литическая активность исследуемых бактериофагов варьировала от $1,2 \pm 0,2 \times 10^7$ до $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ корпускул в 1 мл по Грациа и от 10^{-7} до 10^{-10} по Аппельману. Наибольшим диапазоном лизиса изучаемых культур обладали бактериофаги E4 и E7, суммарный спектр которых составлял более 95 %. Специфичность действия выделенных бактериофагов проверялась на 90 штаммах бактерий – представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherihia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*. Энтеробактерные бактериофаги специфичны по отношению к гомологичным бактериям.

Изучаемые фаги обладали выраженной устойчивостью к воздействию температуры до 65 °C и хлороформу в течение 40 минут [13].

При анализе результатов совокупности проведенных исследований бактериофаг E4 был отобран нами для дальнейшей работы как наиболее производственно-перспективный.

Определяя латентный период внутриклеточного развития фага E4 на клетках *E. dissolvens* 1, установили, что он составляет 22-23 минуты. При этом среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из четвертой пробирки с 15-й по 21-ю минуту опыта было равно 14, а при высеве с 24-й по 60-ю минуту из пятой пробирки – 18,78. Средняя урожайность бакте-

риофага E4 составила $1878:14=134,1$ вирусных частиц на одну микробную клетку индикаторной культуры.

Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага включает в себя определение размера фагового генома, процента его идентичности с таксономически наиболее близкими бактериофагами и проверку отсутствия в составе ДНК генов, кодирующих токсины, интегразы, репрессоры транскрипции и другие нежелательные локусы. Исследования такого рода позволят подтвердить оригинальность и вирулентную природу отобранного штамма энтеробактерного бактериофага E4.

Для определения кодирующих областей генома сравнили собранный геном бактериофага E4 с известными фаговыми ДНК, депонированными в GenBank NCBI. Результаты представлены на рисунке 1.

По результатам проведенных исследований была составлена карта линейной ДНК отобранного нами ранее энтеробактерного бактериофага E4. Далее были определены продукты экспрессии его генов в соответствии с известными аналогами. Качественный состав протеинов фага E4 соответствует белкам аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие как структурных, так и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функций (гипотетические белки), имеющие аналогии в аннотированных геномах других бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Enterobacter*. В таблице 1 представлен биоинформатический анализ соответствия известных генов с данными секвенирования энтеробактерного фага. На основе биоинформатического анализа данных сиквенса было установлено отсутствие локусов патогенности. Так как сама процедура секвенирования довольно финансово затратная и трудоемкая, в данной работе мы показали возможность использования метода полимеразно-цепной реакции для доказательства отсутствия локусов патогенности в геноме бактериофага.

Нами была разработана система молекулярно-генетической индикации автономных генетических элементов (островков патогенности) в геноме бактериофага, активных в отношении *Enterobacter*, с использованием ПЦР.

Для *Enterobacter spp.* в библиотеке баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последо-

Биоинформатический анализ соответствия известных генов с данными секвенирования бактериофага E4

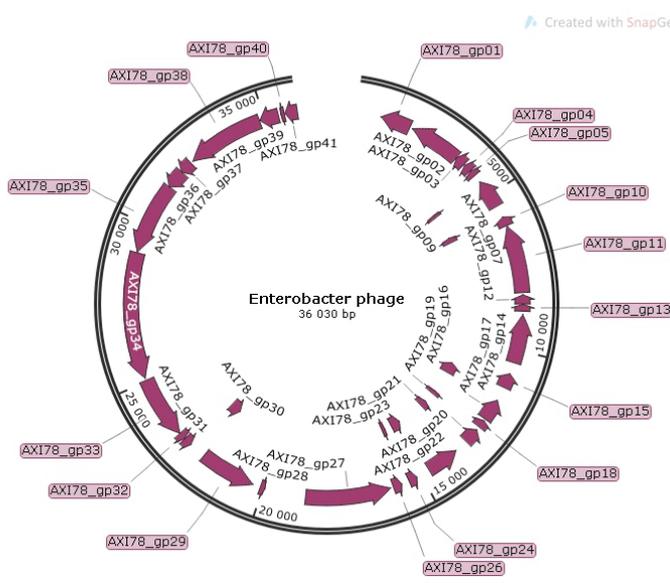


Рис. 1 - Карта линейной ДНК бактериофага E4 с расшифровкой кодирующих областей генома

Sequence: Enterobacter.gp (Linear / 36 030 bp)
Features: 83 visible, 83 total

Feature	Location	Size	Color	Symbol	Type
✓ source	1 .. 36 030	36 030 bp		⊢	source
✓ AXI78_gp01	795 .. 1727	933 bp	■	←	CDS
✓ AXI78_gp01	795 .. 1727	933 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp02	1829 .. 3436	1608 bp	■	←	CDS
✓ AXI78_gp02	1829 .. 3436	1608 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp03	3447 .. 3767	321 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp03	3447 .. 3767	321 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp04	3795 .. 4046	252 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp04	3795 .. 4046	252 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp05	4051 .. 4245	195 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp05	4051 .. 4245	195 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp06	4389 .. 4502	114 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp06	4389 .. 4502	114 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp07	4484 .. 5395	912 bp	■	←	CDS exonuclease
✓ AXI78_gp07	4484 .. 5395	912 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp08	5392 .. 5574	183 bp	■	←	CDS inhibitor of recBCD...
✓ AXI78_gp08	5392 .. 5574	183 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp09	5571 .. 5780	210 bp	■	←	CDS HNS binding protein
✓ AXI78_gp09	5571 .. 5780	210 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp10	5777 .. 6079	303 bp	■	←	CDS HNS binding protein
✓ AXI78_gp10	5777 .. 6079	303 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp11	6096 .. 8210	2115 bp	■	←	CDS DNA polymerase
✓ AXI78_gp11	6096 .. 8210	2115 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp12	8278 .. 8562	285 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp12	8278 .. 8562	285 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp13	8575 .. 8787	213 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp13	8575 .. 8787	213 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp14	8886 .. 10 400	1515 bp	■	←	CDS
✓ AXI78_gp14	8886 .. 10 400	1515 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp15	10 767 .. 11 222	456 bp	■	←	CDS
✓ AXI78_gp15	10 767 .. 11 222	456 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp16	11 215 .. 11 676	462 bp	■	←	CDS endonuclease
✓ AXI78_gp16	11 215 .. 11 676	462 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp17	11 676 .. 12 374	699 bp	■	←	CDS
✓ AXI78_gp17	11 676 .. 12 374	699 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp18	12 427 .. 12 663	237 bp	■	←	CDS
✓ AXI78_gp18	12 427 .. 12 663	237 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp19	12 660 .. 12 797	138 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp19	12 660 .. 12 797	138 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp20	12 784 .. 13 263	480 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp20	12 784 .. 13 263	480 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp21	13 263 .. 13 520	258 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp21	13 263 .. 13 520	258 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp22	13 690 .. 14 706	1017 bp	■	←	CDS DNA ligase
✓ AXI78_gp22	13 690 .. 14 706	1017 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp23	14 703 .. 15 119	417 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp23	14 703 .. 15 119	417 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp24	15 146 .. 15 421	276 bp	■	←	CDS
✓ AXI78_gp24	15 146 .. 15 421	276 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp25	15 421 .. 15 561	141 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp25	15 421 .. 15 561	141 bp	■	←	gene
✓ AXI78_gp26	15 654 .. 15 926	273 bp	■	←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp26	15 654 .. 15 926	273 bp	■	←	gene

Printed from SnapGene® Viewer: nov 28, 2017 6:32 Page 1

вательностей) была определена уникальность гена-кандидата и выбран фрагмент гена *toxin RelE*, кодирующий локус гена инвазивного белка.

После анализа в библиотеках баз данных нуклеотидных последовательностей гена *toxin RelE* они были просканированы системой Blast на предмет совпадения с последовательностями ДНК известных микроорганизмов. Установлено, что данные генетические последовательности являются уникальными для *Enterobacter phage toxinRelE* и не имеют совпадений с другими видами микроорганизмов.

После выбора специфичного гена для молекулярно-генетической идентификации локуса патогенности, носителем которого могут быть бактериофаги, активные в отношении *Enterobacter spp.*, были определены наиболее консервативные участки гена-мишени путем их сравнения у различных штаммов энтеробактерного фага в базе данных GeneBank.

На эти консервативные участки приложением Primer BLAST были предложены праймеры, отвечающие определенным условиям: длина праймеров от 18 до 24 пар нуклеотидов, температура плавления праймера в интервале 55–70 °C, размер фланкируемого участка от 100 до 1000 п.о.

После выбора прямого и обратного праймеров, они были выровнены с помощью программы GeneRunnerVersion 3.05. Кроме того, мы убедились, что димеры на 3'-конце, образующиеся либо при гибридизации праймера с самим собой, либо с партнером, исключены. Также исключены праймеры с удлинением

3'-концом, а самый стойкий общий димер нестабилен.

Данные по подобранным праймерам представлены на рисунке 2 и в таблице 2.

Результаты экспериментальных исследований выявления специфического фрагмента гена *RelE* культур *Enterobacter spp.* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на рисунке 3.

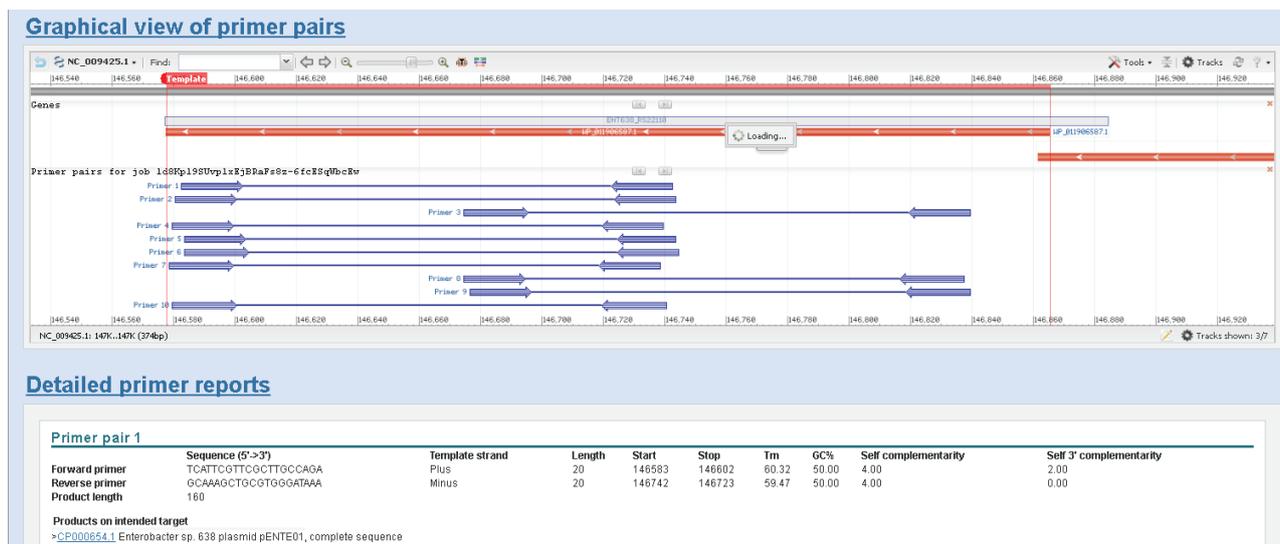


Рис. 2 - Варианты праймерных систем для амплификации гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Enterobacter spp.*

Таблица 2

Характеристика праймеров к участкам гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Enterobacter spp.*

Параметр	Характеристика
участок гена <i>toxin RelE</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	TCATTCGTTGCTTGCCAGA
Обратный праймер (r) 5'-3'	GCAAAGCTGCGTGGGATAAA
Расчетная температура плавления прямого праймера	59.0 °C
Расчетная температура плавления обратного праймера	59.0 °C
Теоретическая специфичность	<i>Enterobacter sp. plasmid pENTE01 toxin RelE gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	160

Таким образом, в геноме выделенного и селекционированного нами фага E4 локусов патогенности выявлено не было.

Выводы

В результате проведенных исследований нами были охарактеризованы новые изоляты бактериофагов, специфичных к *Enterobacter spp.* по основным биологическим свойствам. Дана молекулярно-генетическая характеристика отобранному для дальнейших исследований энтеробактерному фагу E4. На основании полученных секвенсовых данных его генома составлена карта его линейной ДНК. Определены продукты экспрессии генов фага E4 в соответствии с известными аналогами. Качественный состав протеинов изучаемого фага соответствовал белкам аннотированных аналогов, имел четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдалось наличие как структурных, так и неструктурных компонентов. Были выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функций (гипотетические белки), имеющие аналогии в аннотированных

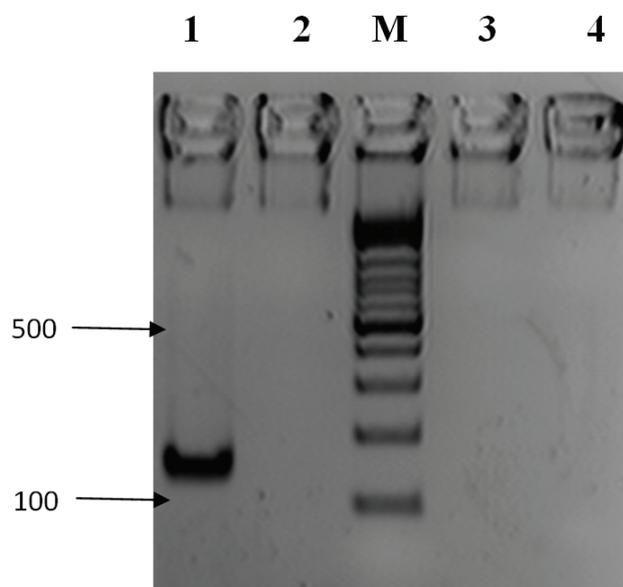


Рис. 3 - Индикация фрагмента гена *RelE*:

M – маркер молекулярного веса, 1 – положительный контроль, 2 – отрицательный контроль, 3-4 – ДНК бактериофагов E4 и E7, специфичных в отношении *Enterobacter spp.*

геномах других энтеробактерных бактериофагов. Была разработана система молекулярно-генетической индикации автономных генетических элементов (островков патогенности) в геноме бактериофага, активных в отношении *Enterobacter*, с использованием ПЦР.

Определена уникальность гена-кандидата, и выбран фрагмент гена *toxin RelE*, кодирующий локус гена инвазивного белка. Характеристика праймеров к участкам гена *toxin RelE* генома фага, активного в отношении *Enterobacter spp.*: прямой праймер - TCATTCGTTTCGCTTGCCAGA; обратный праймер - GCAAAGCTGCGTGGGATAAA; расчетная температура плавления прямого и обратного праймеров - 59,9 °C; теоретическая специфичность - *Enterobacter sp. plasmid pENTE01 toxin RelE gene*; длина амплифицируемого участка – 160 п.о. По результатам экспериментальных исследований выявления специфического фрагмента гена *RelE* культур *Enterobacter spp.* с разработанными системами олигонуклеотидов в геноме энтеробактерного бактериофага E4 локусов патогенности выявлено не было.

Полученные данные позволяют рекомендовать бактериофаг E4, специфичный к бактериям рода *Enterobacter*, для конструирования терапевтического биопрепарата с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных и птицы.

Библиографический список

1. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. – Ульяновск: Копиринг, 2004. – 130 с.
2. Красноголовец, В.Н. Клебсиеллезные инфекции / В.Н. Красноголовец, Б.С. Киселева. - М.: Медицина, 1996. - 256 с.
3. Морозова, О.Т. Биовары и антибиотикорезистентность штаммов *E. cloacae*, выделенных у колонизированных новорожденных / О.Т. Морозова, Н.С. Прямухина // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 1997. - № 3. - С. 18 - 21.
4. Capdevila, J.A. *Enterobacter* Un patogeno humano inusual / J.A.Capdevila, V.Bisbe, I.Gasser // Enform. Infec. Microbial. Clin. - 1998. - № 8. - P. 321 - 329.
5. Короткевич, Ю.В. Антибиотикорезистентность микроорганизмов, загрязняющих пищевые продукты / Ю.В. Короткевич, Н.Р. Ефимочкина, С.А. Шевелева // Современные технологии продуктов питания. Материалы 2-й международной научно-практической конференции. – Курск, 2015. - С. 78 - 81.
6. Свойства энтеробактерий, выделенных из молочных продуктов / Н.Р. Ефимочкина, Н.В. Ростова, Ю.М. Маркова, [и др.] // Молочная промышленность. - 2015. - № 11. - С. 33 - 36.
7. Шипицына, И.В. Адгезивная способность клинических штаммов *Enterobacter cloacae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом, и их чувствительность к антимикробным препаратам / И.В. Шипицына, Е.В. Осипова, Л.В. Розова // Новости хирургии. – 2017. - Том 25, № 3. - С. 273 - 278.
8. Hernandez, A. Metal accumulation and vanadium – induced mulcting resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae* / A. Hernandez, R. Mellado // Appl and Environ Microbiol. - 1998. - № 1. - P. 46 - 47.
9. Пименов, Е.В. Выделение и характеристика штаммов бактерий, резистентных к соединениям мышьяка / Е.В. Пименов, И.В. Дармов, И.П. Погорельский // Микробиология. - 1996. - № 2. - С. 12 - 13.
10. Rai, R. Salt stress sensitivity of nitrogen fixation in *Enterobacter* strains / R. Rai, G. Kieder // J. Gen. and Appl. Microbiol. - 1998. - V. 44, № 6. - P. 365 - 370.
11. Формирование устойчивости *Enterobacter cloacae* и *Pseudomonas aerogenosa* к дезинфектантам под воздействием бактерицидных концентраций препаратов в эксперименте продуктов / В.И. Сергеевнин, Т.В. Ключкина, Э.О. Волкова, [и др.] // Медицинский альманах. - 2015. - № 5 (40). - С. 112 - 115.
12. Изучение толерантности энтеробактерий к хлорсодержащим биоцидным средствам в экспериментальных моделях с использованием хромогенных индикаторных тест-систем / Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Быкова, Ю.В. Короткевич, [и др.] // Анализ риска здоровью. - 2015. - № 3 (11). - С. 73 - 82.
13. Васильев, Д.А. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – № 9. – С. 69 - 70.
14. Сульдина, Е.В. Основные биологические свойства листериозных бактериофагов / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VI Международной научно-практической конференции. Часть III. - Ульяновск, ГСХА им. П.А. Столыпина. - 2015. – С. 125 - 127.
15. 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.

CHARACTERISTICS OF BACTERIOPHAGES OF ENTEROBACTER SPP BACTERIA FOR EVALUATING THE POSSIBILITY OF THEIR USAGE AS PART OF THERAPEUTIC AGENT

Suldina E.V., Vasilyev D.A., Feoktistova N.A., Mastilenko A.V.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU
432017, Ulyanovsk, Novyy 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 isolation and study of the biological and genetic characteristics of bacteriophages of Enterobacter genus bacteria. Isolates of bacteriophages specific to Enterobacter spp are characterized on the basis of the main biological properties. The molecular and genetic characteristics of entero-bacterial E4 phage selected for further studies was given. Based on the sequencing data obtained by studying the genome, a map of its linear DNA has been compiled. Expression products of E4 phage genes were determined in accordance with known analogues. A system of molecular-genetic indication of autonomous genetic elements in the bacteriophage genome active against Enterobacter using PCR was developed. Uniqueness of the candidate gene was determined and the gene fragment of toxin RelE, encoding the locus of the invasive protein gene, was selected. The results of experimental studies of the detection of a specific fragment of the gene RelE of Enterobacter spp. cultures with developed systems of oligonucleotides in the genome of enterobacter E4 bacteriophage confirmed the virulent nature of the selected bacteriophage and absence of pathogenicity loci. The data obtained make it possible to recommend E4 bacteriophage, specific to bacteria of Enterobacter genus, for construction of a therapeutic biological agent for prevention and treatment of gastrointestinal diseases of young farm animals and poultry.

Bibliography

1. Zolotukhin, S.N. Little studied enterobacteria and their role in animal pathology / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk: Copyring, 2004. - 130 p.
2. Krasnogolovets, V.N. Klebsiella infections / V.N. Krasnogolovets, B.S. Kiseleva. - Moscow: Medicine, 1996. - 256 p.
3. Morozova, O.T. Biovars and antibiotic resistance of E.cloacae strains isolated from colonized newborns / O.T. Morozova, N.S. Pryamukhina // Epidemiology and infectious diseases. - 1997. - № 3. - P. 18 - 21.
4. Capdevila, J.A. Enterobacter Un patogeno humano inusual / J.A.Capdevila, V.Bisbe, I.Gasser // Enform. Infec. Microbial. Clin. - 1998. - № 8. - P. 321 - 329.
5. Korotkevich, Yu.V. Antibiotic resistance of microorganisms which contaminate food products / Yu.V. Korotkevich, N.R. Efimochkina, S.A. Sheveleva // Modern technologies of food products. Materials of the 2 nd International Scientific and Practical Conference. - Kursk, 2015. - P. 78 - 81.
6. Properties of enterobacteria isolated from dairy products / N.R. Efimochkina, N.V. Rostova, Yu.M. Markova, [et alt.] // Dairy industry. - 2015. - № 11. - P. 33 - 36.
7. Shipitsyna, I.V. Adhesive capacity of clinical strains of Enterobacter cloacae isolated from wounds of patients with chronic osteomyelitis, and their sensitivity to antimicrobial agents / I.V. Shipitsyna, E.V. Ospova, L.V. Rozova // News of Surgery. - 2017. - Volume 25, № 3. - P. 273 - 278.
8. Hernandez, A. Metal accumulation and vanadium – induced mulcting resistance by environmental isolates of Escherichia hermannii and Enterobacter cloacae / A. Hernandez, R. Mellado // Appl and Environ Microbiol. - 1998. - № 1. - P. 46 - 47.
9. Pimenov, E.V. Isolation and characteristics of bacteria strains resistant to arsenic compounds / E.V. Pimenov, I.V. Darmov, I.P. Pogorelsky // Microbiology. - 1996. - № 2. - P. 12 - 13.
10. Rai, R. Salt stress sensitivity of nitrogen fixation in Enterobacter strains / R. Rai, G. Kieder // J. Gen. and Appl. Microbiol. - 1998. - V. 44, № 6. - P. 365 - 370.
11. Resistance formation of Enterobacter cloacae and Pseudomonas aerogenosa to disinfectants under the influence of bactericidal concentrations of preparations in the experiment of products / V.I. Sergevnnin, T.V. Klyukina, E.O. Volkova, [et alt.] // Medical almanac. - 2015. - № 5 (40). - P. 112 - 15.
12. Study of enterobacteria tolerance to chlorinated biocidal agents in experimental models using chromogenic indicator test systems / N.R. Efimochkina, I.B. Bykova, Yu.V. Korotkevich, [et alt.] // Health risk analysis. - 2015. - № 3 (11). - P. 73 - 82.
13. Vasilyev, D.A. Isolation of bacteriophages of Listeria genus bacteria / D.A. Vasilyev, E.N. Kovaleva, E.V. Suldina // Infection and immunity. - 2014. - № 9. - P. 69 - 70.
14. Suldina, E.V. The main biological properties of listeriosis bacteriophages / E.V. Suldina, D.A. Vasilyev, E.N. Kovaleva // Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions. Materials of the VI international scientific and practical conference. Part III. - Ulyanovsk, SAU named after P.A. Stolypin. - 2015. - P. 125 - 127.
15. Bacteriophages of Enterobacter bacteria and their basic biological characteristics / E.V. Suldina, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin, Bogdanov I.I. // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017. - № 4 (40). - P. 94 - 98.