

Таблица 4 – Диастазное число

Название фирмы	Диастазное число, ед. Готе	
	Требования согласно ГОСТу 19792-2001	Проба
№1 «Цветочный мед»(n=5)	Не ниже 7	8,3
№2 «Стародуб» (n=5)		12,0
№3 «Мед Алтай» (n=5)		6,4
№4 «Добрый мед» (n=5)		10,0
№5 «Медок» (n=5)		7,2

**Выводы.** По результатам органолептических исследований пришли к выводу, что все сорта меда, приобретенные на территории рынка «ОтауСауда», соответствуют норме. По физико-химическим показателям исследуемые пробы были в норме. Массовая доля воды, количество падевого меда и токсичность соответствует ГОСТу. Результаты исследований на фальсификацию меда показали, что в исследованных пробах выявлено отклонений не было. Диастазное число в одном из исследуемых образцов (Проба №3 – донниковый), было ниже нормы – 6,4.

#### Список литературы

1. Балабанова, Т.Н. Исследование свойств мёда // Пчеловодство. 1995. №3. С. 37-38.
2. Гробов О.Ф., Ключко Р.Т. Критерии оценки меда и продуктов пчеловодства – требования ВТО // Пчеловодство. 2004. № 8. С. 5-7.
3. Топольский П., Савутькова А. Ветеринарно-санитарная экспертиза меда Тюменской области // Пчеловодство. 2005. №6. С. 29-33.
4. Фарамазян, А.С. Контроль качества мёд // Пчеловодный вестник. 2003. №9. С. 23-28.

DOI:10.34617/7b8b-3147  
УДК 578.81:578.233.424

### ЭВОЛЮЦИОННЫЕ СВЯЗИ АКТИНОФАГА GILGAMESH И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

Никулин Никита Алексеевич<sup>1</sup>

Лу Иньхуа<sup>2</sup>, PhD Biol.Sci.

Зимин Андрей Антонович<sup>1</sup>, канд. биол. наук

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино, Российская Федерация

<sup>2</sup> Колледж естественных наук, Педагогический университет Шанхая, г. Шанхай, Китай

Актинофаги – это потенциальные средства контроля патогенных актиномицетов в ветеринарии и перспективные инструменты синтетической биологии актиномицетов – продуцентов физиологически активных веществ. Бактериофаг *Streptomyces Gilgamesh* обладает геномом длиной 129136 п.н., для которого характерны циклические перестановки. Исследование филогенетических связей основного капсидного белка показало, что генетический модуль сборки капсида данного бактериофага имеет сходства с актинофагами родов *Gordonia* и *Brevibacterium*, а также меньшее сходство

с гомологами фагов морских бактерий. На основе пан-геномного анализа предположена возможность общей трансдукции данным фагом.

**Ключевые слова:** актиномицеты; бактериофаги; актинофаги; геномика; бактериофаг *Streptomyces* Gilgamesh; MCP-белок; пангеном; филогенетические деревья

### ACTIVOPHAGE GILGAMESH EVOLUTIONAL RELATIONS AND ITS PERSPECTIVES FOR DESIGN OF ANTIBIOTIC PRODUCERS

Nikulin Nikita Alekseevich<sup>1</sup>,

Lu Ynhua<sup>2</sup>, PhD Biol. Sci.

Zimin Andrei Antonovich<sup>1</sup>, PhD Biol. Sci.

<sup>1</sup>*G. K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS – a separate subdivision of the Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», Pushchino, Russian Federation*

<sup>2</sup>*College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai, China*

Actinophages are potential agents of controlling pathogenic actinomycetes in veterinary medicine and perspective tools for the synthetic biology of actinomycetes-producers of physiologically active substances. The *Streptomyces* bacteriophage Gilgamesh has a genome of 129136 bp, which is characterized by circular permutations. A research of the phylogenetic relationships of the main capsid protein showed that the genetic module of the capsid assembly of this bacteriophage has similarities with the actinophages of the genera *Gordonia* and *Brevibacterium*, as well as less similarity with the homologs of phages of marine bacteria. Based on pan-genomic analysis, the possibility of general transduction by this phage is supposed.

**Key words:** actinomycetes; bacteriophage; actinophage; genomics; *Streptomyces* bacteriophage Gilgamesh; MCP-protein; pangenome; phylogenetic tree

Актинобактерии вызывают ряд заболеваний сельскохозяйственных животных. Например, это хронические актиномикозы коров, которые влияют на продуктивность животноводства и снижают качество говядины. Микобактериальные инфекции коров известны достаточно давно и фаговый контроль этих актинобактерий является пока не решенной перспективой развития ветеринарии. Бактериофаги ранее были широко использованы для контроля различных патогенных бактерий в ветеринарии и медицине [1, 2]. Актинофаги – это также потенциальные средства контроля патогенных актиномицетов в ветеринарии и весьма перспективные инструменты синтетической биологии актиномицетов – продуцентов физиологически активных веществ, включая новые антибиотики. В последнее время растет интерес к бактериофагам, которые инфицируют виды *Streptomyces*, поскольку эти бактериофаги могут оказаться основой для

конструирования и вспомогательными элементами для развития клонирующих векторов. Новые векторы могут открыть путь для генетических манипуляций с конкретными видами стрептомицетов как важного инструмента для получения продуцентов лекарственных веществ и также новых пробиотиков. Механизмы и различные молекулярные системы, используемые фагом, могут оказаться востребованы в генетических исследованиях по производству активных веществ и привести к разработке новых биотехнологических процессов [7]. Для многих видов рода *Streptomyces* ещё не выделены бактериофаги.

#### Методика исследований.

**Методы и программные средства.** Методы филогенетического анализа MCP-белка. Для построения филогенетического дерева основного капсидного белка фага Gilgamesh был использован алгоритм поиска максимального правдоподобия – Maximal likelihood, при этом

исходное дерево было построено методом максимальной экономии - Maximum Parsimony на основе множественного выравнивания, выполненного программным средством MUSCLE в пакете MegaX [6]. Поиск гомологов этого белка в GenBank проводили с использованием алгоритма PSI-BLAST с уровнем достоверности результатов E-value <2e-39. Полученный файл с а.к. последовательностями гомологов основного капсидного белка фага Gilgamesh в формате FASTA объединили в один файл и использовали для обработки в пакете программ MEGA X [6]. Для анализа использовали 69 гомологов. Дерево на рисунке 1 построено в масштабе, где длина ветвей измеряется числом замен на сайт.

#### **Методы пан-геномного анализа.**

Для пан-геномного анализа были использованы геномы бактериофагов, близких по гомологии МСР к главному белку головки фага Gilgamesh. Анализ проведен при помощи скриптов get\_homologues [4]. Для кластеризации гомологичных белков использовали get\_homologues.pl с параметрами -C (покрытие) 20, E (E-value) 1e-4, G (алгоритм COG), остальные параметры без изменения. Для получения пан-геномной матрицы наличия/отсутствия гомологичных белков в отдельных геномах использовали compare\_clusters.pl. Для определения композиции пан-генома и наличия кластеров из композиции в отдельных геномах использовали parse\_pangenome\_matrix.pl, также данный скрипт использовался для построения геномных карт с отраженными общими для всех выбранных геномов кластерами. Дополнительно, для определения возможных функций белков фага Gilgamesh, чьи гомологи были найдены у других фагов, использовали BLASTp для поиска схожих аминокислотных последовательностей с предсказанными функциями. Для построения дерева использовали скрипт get\_phylomarkers [9] estimate\_pangenome\_phylogenies.sh с па-

раметром -r (количество независимых репликаций) 100 и бинарную матрицу наличия/отсутствия кластеров.

**Результаты исследований и их обсуждение. Филогенетический анализ МСР-белка актинофага Gilgamesh.** Алгоритм Maximal Likelihood использует уже готовые деревья, построенные другими методами и оптимизирует их на основе вероятностного расчета взаимных изменений в последовательностях символов, описанных во множественном элайменте. На рисунке 1 представлено филогенетическое дерево, построенное с учетом 1000 бутстрэпов. Полученное дерево разделено на две ветви. Оба фага стрептомицетов находятся на нижней ветви.

Ближайшее окружение МСР-белка фага Gilgamesh состоит из белков фагов актиномицет родов *Gordonia* и *Brevibacterium*, но соседняя ветвь содержит белки фагов исключительно морских бактерий родов *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas* и *Idiomarinaceae*. МСР-белок другого стрептомицетного бактериофага mu1/6 образует отдельную подветвь, соседние подветви состоят из ветви с МСР-белков фагов бактерий родов *Microbacterium* и *Propionobacterium*, а также ветви белков фагов *Arthrobacter*, *Gordonia* и *Mycobacterium*.

Другую большую ветвь образуют аминокислотные последовательности МСР-белков фагов почти целиком грам-отрицательных бактерий родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Psychrobacter*, *Bruchoderia*, *Vibrio*, *Moraxella*, *Xantomonas*, *Paracoccus*, *Cronobacter*, а также двух некультивируемых фагов 7AX4\_59 и Mediterranean phage uvMED. Интересно, что гомологичный основному белку капсида актинофага оказался белок гигантского вируса одноклеточной водоросли *Tetraselmis viridis*.

**Пан-геномный анализ.** Геномы, использованные в пан-геномном анализе представлены в таблице 1.

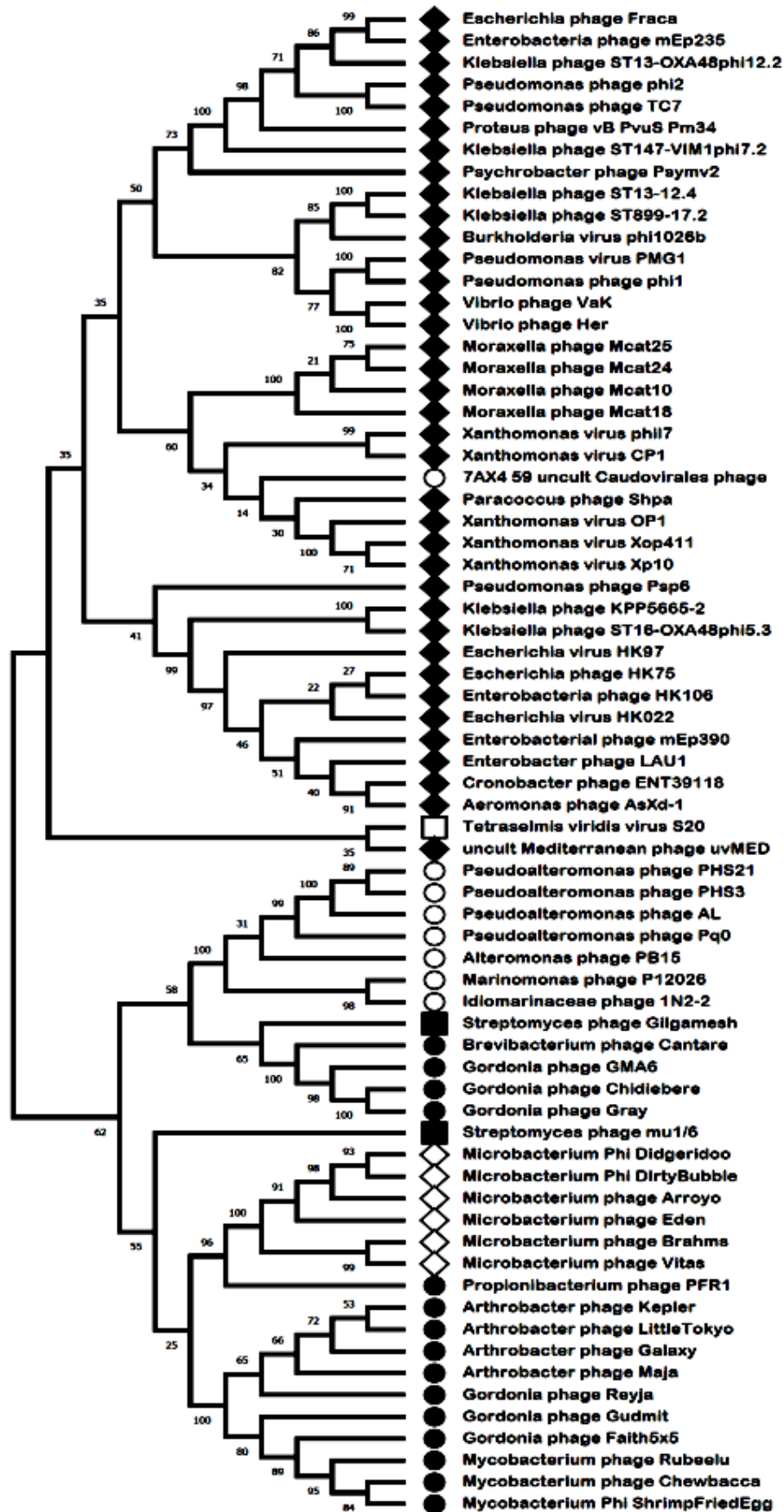


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево гомологов MCP-белка актинофага *Streptomyces Gilgamesh*

Таблица 1 – Геномы фагов, использованные для пан-геномного анализа

Номер доступа GenBank	Название бактериофага
MN834616.1	Arthrobacter phage Kepler
MN703409.1	Arthrobacter phage LittleTokyo
MN926055.1	Mycobacterium phage Chewbacca
MK524528.1	Mycobacterium phage ShrimpFriedEgg
MN399787.1	Mycobacterium phage Rubeelu
KY379511.2	Pseudoalteromonas phage PHS21
KX912252.1	Pseudoalteromonas phage PHS3
MT002875.1	Pseudoalteromonas phage AL
NC_029100.1	Pseudoalteromonas phage Pq0
KX982260.1	Alteromonas phage PB15
NC_018269.1	Marinomonas phage P12026
NC_025439.1	Idiomarinaceae phage 1N2-2
MN234216.1	Streptomyces phage Gilgamesh
MK016493.1	Brevibacterium phage Cantare
NC_030906.1	Gordonia phage GMA6
MN586022.1	Gordonia phage Chidiebere
MK279853.1	Gordonia phage Gray
NC_007967.1	Streptomyces phage mu1/6
MN045566.1	Microbacterium phage Didgeridoo
MN062714.1	Microbacterium Phage DirtyBubble
MK937610.2	Microbacterium phage Arroyo
MN509447.1	Microbacterium phage Eden
MN834602.1	Microbacterium phage Brahms
MN183281.1	Microbacterium phage Vitas
NC_031076.1	Propionibacterium phage PFR1
NC_041876.1	Arthrobacter phage Galaxy
MK279899.1	Arthrobacter phage Maja
MK814759.1	Gordonia phage Reyja
MN813685.1	Gordonia phage Gudmit
MN585966.1	Gordonia phage Faith5x5

После кластеризации размеры компонентов пан-генома (кор-геном, софт-кор-геном, оболочка, облако) были следующие (рисунок 2). В результате, у бактериофага *Streptomyces phage Gilgamesh* обнаружено наличие 2 белков, принадлежавшим кор-геному (то есть все фаги имели общие гомологи данных белков), 146 — облаку (белки или не имеют гомологов, или гомологи имеются только у одного фага), 4 — оболочке (гомологи обнаружены от 2 до менее 28 фагов). При рассмотрении облака был обнаружен один кластер, который состоял из одного

белка фага *Gilgamesh* и *Propionibacterium phage PFR1*. Обнаруженные белки в кор-геноме: главный белок головки (MCP), слитые портовый и MuF-подобный белки (portal and MuF-like fusion protein); в оболочке: протеаза проголовки семейства HK97 (у 27 фагов), tail tape measure protein (необходим для определения длины хвоста) (у 19 фагов), SSB (single strand binding) белок (у 6 фагов); HNH (homing) эндонуклеаза (у 4 фагов); белок хвоста (у 2 фагов). Также было получено пан-геномное дерево данных фагов (Рисунок 2)

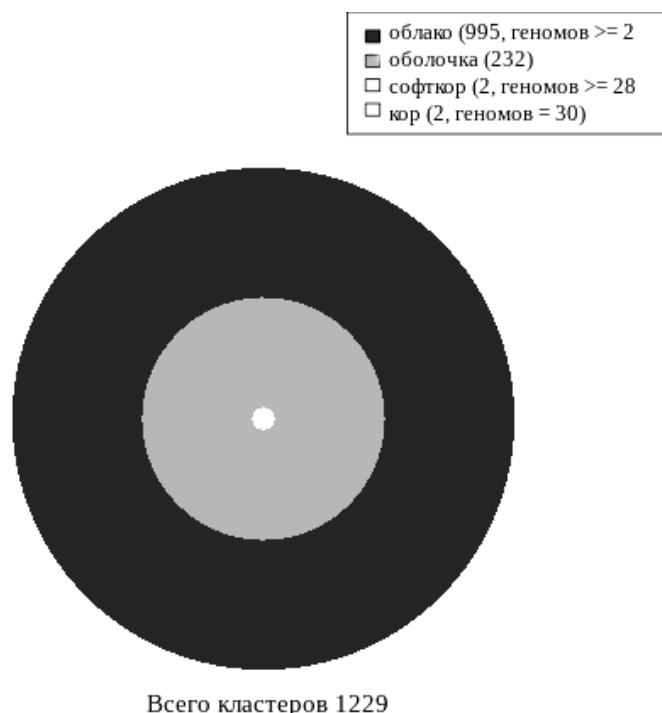


Рисунок 2 – Размеры компонентов пан-генома рассматриваемых фагов

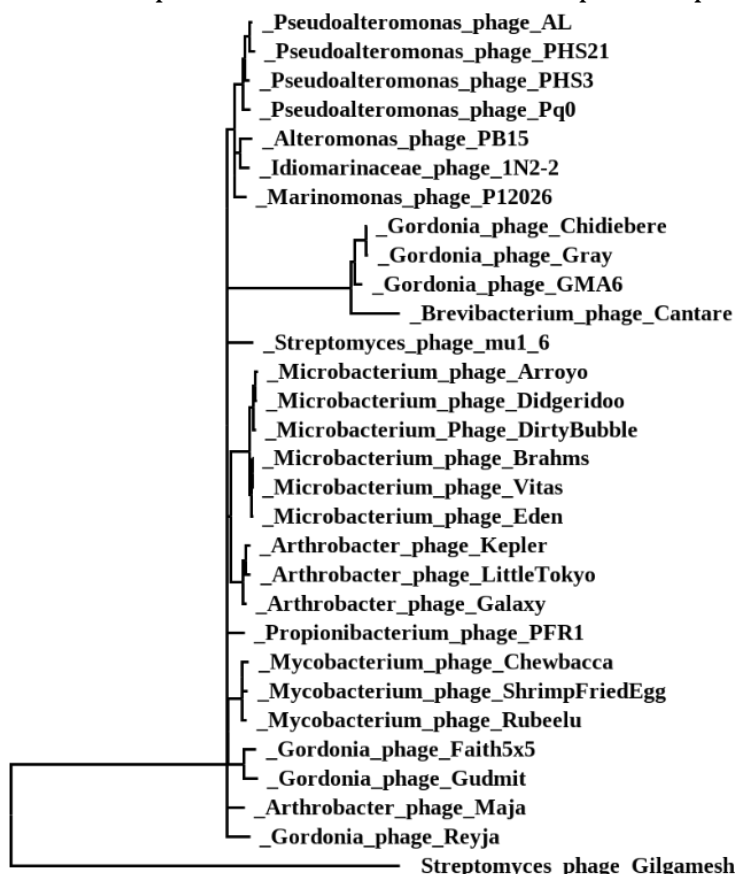


Рисунок 3 – Пан-геномное дерево, построенное по матрице наличия/отсутствия кластеров гомологичных белков

Число компонентов пан-генома у отдельных геномов представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Число компонентов пан-генома в отдельном геноме

Название фага	облако	оболочка	софткор	кор
Alteromonas phage PB15	46	13	2	2
Arthrobacter phage Galaxy	21	42	2	2
Arthrobacter phage Kepler	33	40	2	2
Arthrobacter phage LittleTokyo	30	41	2	2
Arthrobacter phage Maja	44	9	2	2
Brevibacterium phage Cantare	96	31	2	2
Gordonia phage Chidiebere	58	69	2	2
Gordonia phage Faith5x5	59	10	2	2
Gordonia phage GMA6	44	68	2	2
Gordonia phage Gray	53	69	2	2
Gordonia phage Gudmit	60	11	2	2
Gordonia phage Reyja	52	10	2	2
Idiomarinaceae phage 1N2-2	42	12	2	2
Marinomonas phage P12026	37	15	2	2
Microbacterium Phage DirtyBubble	8	57	2	2
Microbacterium phage Arroyo	13	54	2	2
Microbacterium phage Brahms	5	61	2	2
Microbacterium phage Didgeridoo	12	60	2	2
Microbacterium phage Eden	8	59	2	2
Microbacterium phage Vitas	5	61	2	2
Mycobacterium phage Chewbacca	32	40	2	2
Mycobacterium phage Rubeelu	23	41	2	2
Mycobacterium phage ShrimpFriedEgg	28	40	2	2
Propionibacterium phage PFR1	41	12	2	2
Pseudoalteromonas phage AL	20	27	2	2
Pseudoalteromonas phage PHS21	25	23	2	2
Pseudoalteromonas phage PHS3	27	29	2	2
Pseudoalteromonas phage Pq0	29	25	2	2
Streptomyces phage Gilgamesh	146	4	2	2
Streptomyces phage mu1/6	48	1	2	2

**Обсуждение.** При проведении пан-геномного анализа фага Gilgamesh и близких к нему по гомологии MCP фагов было выявлено малое число схожих белков между целевым вирусом и остальными. В отличие от него, как показано в таблице 2, близкие к нему по гомологии MCP фаги в основном имеют большее число гомологов между собой. Графически, это отражается при помощи пан-геномного дерева, где основными характеристиками удаленности ветвей являются наличие или отсутствие кластеров гомологичных белков и их количество.

Как можно видеть, Gilgamesh по данным параметрам является наиболее удаленным. По результатам же филогенетического анализа MCP, показано, что наиболее удаленным фагом является Streptomyces phage mu1/6. Действительно, по числу кластеров, входящих в оболочку пан-генома Gilgamesh, превосходит фаг mu 1/6, однако в облаке пан-генома наблюдается совершенно другая картина. Можно предположить, что такая картина построения пан-геномного дерева связана с большим влиянием горизонтального переноса генов на данные фаги.

Если мы рассмотрим композицию пан-генома, то можно заметить, что в состав кор-генома входят белки, которые гомологичны слитым порталным и MuF-подобным белкам. По данным литературы известно, что фаги, у которых имеется домен MuF (от названия белка F фага Mu), а также он находится после порталного белка кодируют токсины [5]. Также было экспериментально наиболее полно показано участие в трансдукции для минорного белка головки, содержащего MuF домен (показано позже), фага *Bacillus phage SPP1* [8]. Он также находится после порталного белка. В геноме *Bacillus phage SPP1* (NC\_004166) близко к гену, кодирующему MuF-подобный белок (3802..4728) находится ген (5412..5648), кодирующий монооксигеназу, участвующую в синтезе антибиотиков. Аналогично этому, мы проверили (5412..5648) геном фага *Gilgamesh*. Рядом с рамками считывания (29138..31591), кодирующими слитые порталный и MuF-подобный белки, находились рамки считывания (31978..45852), кодирующие белок состоящий из 4624 аминокислотных остатков. При проверке BLASTn данных рамок, оказалось, что часть данной последовательности сильно схожа с нуклеотидной последовательностью генома *Streptomyces* sp. PBN53 (CP011799.1). Таким образом, можно предположить, что гомологи, которые найдены у большинства фагов (входящие в кор-геном и частично оболочку), являются существенными для рассматриваемых фагов, так как они, вероятнее всего, осуществляют трансдукцию, наиболее полно в данной работе это показано для целевого фага *Gilgamesh*. Поэтому, мы можем наблюдать такую разницу между филогенетическим и пан-геномным деревьями, так как вероятнее всего в фаг *Gilgamesh* произошла вставка части генома бактерии хозяина и при аннотировании образовалось большое число транслированных рамок считывания. Также стоит отметить, что эволюция бактериофагов явля-

ется модулярной [3], а отбор фагов производился по основному белку капсида, в данном случае мы можем также наблюдать наследование модуля, связанного с образованием капсида.

#### **Выводы.**

1. С помощью алгоритма Maximal Likelihood было построено филогенетическое дерево гомологов основного белка капсида актинофага *Streptomyces Gilgamesh* и показано, что этот белок наиболее близок к белкам фагов актиномицет родов *Gordonia* и *Brevibacterium*.

2. Среди более эволюционно удаленных гомологов MCP *Gilgamesh* белки фагов Syphoviridae морских бактерий *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas* и *Idiomarinaceae*, ряда родов актинобактерий, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Arthrobacter*, *Gordonia* и *Mycobacterium*, а также фагов грам-отрицательных бактерий родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Psychrobacter*, *Bruchoderia*, *Vibrio*, *Moraxella*, *Xantomonas*, *Paracoccus* и *Cronobacter*.

3. С помощью алгоритма Psi-Blast было показана гомология основного белка капсида актинофага *Gilgamesh* белку вируса одноклеточной водоросли *Tetraselmis viridis*.

4. Был проведен анализ компонентов пан-генома фагов близких по гомологии MCP к фагу *Gilgamesh*, выявлена транслированная рамка считывания, состоявшая из двух белков (портальный белок капсида и MuF-подобный белок капсида), которая также, как и MCP, консервативно наследуется среди данной группы фагов.

5. В геноме актинофага *Gilgamesh* и близких ему фагов обнаружено сходство ряда генетических элементов с геномом фага SPP1 *Bacillus subtilis*, обладающего способностью к общей или генерализованной трансдукции.

**Благодарности.** Исследование было частично поддержано и выполнено в рамках гранта РФФИ №20-54-53018 ГФЕН\_а для Зимина А.А. и Никулина Н.А.



### Список литературы

1. Зимин, А.А. Использование бактериофагов для борьбы с колибактериозом и кампилобактериозом в птицеводстве / А.А. Зимин, Ф.В. Кочетков, С.И. Кононенко, Д.В. Осепчук, Н.Э. Скобликов // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. 2016. №09(123). С. 421-432.
2. Никулин, Н.А. Конструирование терапевтических фаговых коктейлей на основе бактериофагов Т4-типа: преимущества и недостатки / Н.А. Никулин, С.И. Кононенко, А.Г. Коцаев, А.А.Зимин // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. 2017. №. 133 (09). С. 823-849
3. Botstein, D.A Theory of modular evolution for bacteriophages / D.A. Botstein / Ann N Y Acad Sci. 1980. November; 354: 484-490.
4. Contreras-Moreira, B. GET\_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis // B. Contreras-Moreira, P. Vinuesa / Appl Environ Microbiol. 2013. October; 79(24): 7696-7701.
5. Jamet, A.A. Widespread family of polymorphic toxins encoded by temperate phages / A. Jamet, M. Touchon, B. Ribeiro-Gonçalves, et al. // BMC Biol. 2017. August; 15(1): 75.
6. Kumar S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura // Molecular Biology and Evolution. 2018. June. 35(6): 1547-1549.
7. Rutherford, K. The ins and outs of serine integrase site-specific recombination / K. Rutherford, G.D. Van Duyne // Curr Opin Struct Biol. 2014. February. 24: 125-131.
8. Vinga, I. The minor capsid protein gp7 of bacteriophage SPP1 is required for efficient infection of *Bacillus subtilis* / I. Vinga, A. Dröge, A.C. Stiege, R. Lurz et al. // Mol Microbiol. 2006. August. 61(6): 1609-1621.
9. Vinuesa, P. GET\_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas* / P. Vinuesa, L.E. Ochoa-Sánchez, B. Contreras-Moreira Front Microbiol. 2018. May. 9: 771.

DOI:

УДК 636.4.082.4:618.14-002

### НЕКОТОРЫЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ КАЧЕСТВА СВИНОМАТОК ПРИ ТЕРАПИИ ПОСЛЕРОДОВОГО ЭНДОМЕТРИТА

**Осипчук Галина Владимировна**, научный сотрудник

*Научно-практический институт биотехнологий в зоотехнии и ветеринарной медицине, с. Максимовка, Республика Молдова*

Изучены новые средства (тканевый препарат и препараты на основе экстрактов растений содержащие хелатные соединения йода) и их влияние на репродуктивные показатели. Тканевый препарат инъецировали из расчета 1 мл/100 кг массы тела. Препараты на основе экстрактов растений и хелатного соединения йода вводили внутриматочно в дозе 100–150 мл. При исследовании было установлено, что: масса гнезд в опытных группах возросла в 4,753 и 5,554 раз, что на 3,124 % и 20,05 % больше, по сравнению с контролем; сохранность приплода на 4,74 % и 1,17 5% больше, чем в контроле. Новые средства, применяемые для терапии послеродового эндометрита, не ока-