

## ПОДБОР СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ НА ОСНОВЕ ГЕНА 16S рРНК ДЛЯ БАКТЕРИЙ «ГРУППЫ *VACILLUS CEREBUS*»

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

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

**Мастиленко 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; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

**Ключевые слова:** группа *Vacillus cereus*, праймеры, параметры, ПЦР РВ, метод, идентификация

В статье описаны результаты исследований по подбору специфических праймеров на основе гена 16S рРНК для бактерий «группы *Vacillus cereus*», которая включает виды *Vacillus cereus*, *Vacillus anthracis*, *Vacillus mycoides*, *Vacillus thuringiensis*, *Vacillus cytotoxicus*, *Vacillus weihenstephanensis* (определена структура гена, консервативные регионы данного гена представленных в системе NCBI (BLAST nucleotide и PRIMER BLAST) штаммов вышеназванных групп, проведено множественное выравнивание гена и подбор праймеров). Синтез праймеров и зондов осуществлялся методом химического концентрирования на приборе ASM-800 (фирма «Биоссет», г. Новосибирск). Олигонуклеотиды, способные специфически связываться с представителями всей «группы *Vacillus cereus*» - GCGGTAATACGTAGGTGGCA-GTTTACGGCGTGGACTACCA. В результате ряда проведенных экспериментов по оптимизации были определены параметры постановки полимеразно-цепной реакции, при которой наблюдается амплификация максимального количества специфического продукта реакции: температура отжига праймеров – 60°C, а их количество – по 8 пмоль/реакцию. При использовании 16 референс и 116 выделенных из окружающей среды штаммов исследуемой «группы *Vacillus cereus*» была проведена валидация ПЦР. В итоге отнесены 132 штамма были идентифицированы как представители «группы *Vacillus cereus*». Постановка ПЦР с детекцией в режиме реального времени с применением праймеров, специфичных для представителей «группы *Vacillus cereus*», рекомендуется как метод первичной идентификации вышеназванных бактерий и способ индикации в объектах ветеринарно-санитарного надзора, чувствительность которого составляет  $10^2$ - $10^3$  мк.к/г.

**Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2018 году.**

### Введение

«Группа *Vacillus cereus*» включает бактерии следующих видов: *Vacillus cereus*, *Vacillus anthracis*, *Vacillus mycoides*, *Vacillus thuringiensis*, *Vacillus cytotoxicus*, *Vacillus weihenstephanensis*). Представители рода *Vacillus*, за исключением *Vacillus anthracis* и *Vacillus cereus*, в норме не оказывают патогенного действия, но при ослаблении защитных сил макроорганизма могут вызывать острый, клинически выраженный патологический процесс у человека, животных и рыб [1-4].

По литературным данным до настоящего времени не разработано универсальной и максимально достоверной системы для дифференциации 95 видов рода *Vacillus*. Многими исследователями доказано, что внутривидовое разграничение рода *Vacillus* представляется достаточно сложным и не всегда достоверным. Физиолого-биохимические признаки, по которым принято дифференцировать виды, часто изменчивы и ненадежны [5-8]. Известно, что молекулярно-

генетическая дифференциация имеет высокую разрешающую способность и может исключить различные интерпретации, которые связаны с фенотипической изменчивостью бацилл [9-10]. Поэтому разработка метода идентификации бактерий «группы *Vacillus cereus*» с применением молекулярно-генетических методов исследования является актуальной темой для исследований.

Цель исследований - подобрать специфические для бактерий «группы *Vacillus cereus*» праймеры на основе гена 16S рРНК, оптимизировать методику постановки полимеразно-цепной реакции с детекцией «в режиме реального времени» и апробировать полученные результаты на полевых и референс-штаммах *Vacillus cereus*, *Vacillus anthracis*, *Vacillus mycoides*, *Vacillus thuringiensis*

### Объекты и методы исследований

В строго контролируемых экспериментах использовали чистые штаммы культур бакте-

BC4894 16S ribosomal RNA [ *Bacillus cereus* ATCC 14579 ]

Gene ID: 1207236, updated on 2-Apr-2013

**Summary**

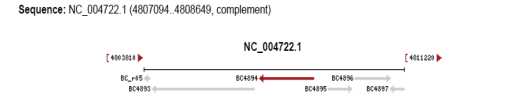
Gene symbol: BC4894  
 Gene description: 16S ribosomal RNA  
 Locus tag: BC4894  
 Gene type: rRNA  
 RNA name: 16S ribosomal RNA  
 Organism: *Bacillus cereus* ATCC 14579 (strain: ATCC 14579)  
 Lineage: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group

**Bacillus cereus ATCC 14579 chromosome, complete genome**

LOCUS NC\_004722 1556 bp DNA linear CON 28-AUG-2016

/locus tag="BC4894"  
 /product="16S ribosomal RNA"  
 /note="rRNA operon M; BC4894"  
 /db xref="GeneID:1207236"

**Genomic context**



**Genomic regions, transcripts, and products**

Sequence: NC\_004722.1 (4807094..4808649, complement)

Genomic Sequence: NC\_004722.1

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)

ORIGIN

```

1 ctttattgga gagtttgatc ctggctcagg atgaacgctg gggcgtgccc taatacatgc
61 aagtcgagcg aatggattaa gagcttgctc ttaatgaagt agcggcgagc gggtgagtaa
121 cactggggtt acctgcccac aagactggga taactccggg aaacgggggc taataccgga
181 taacattttg aaccgcattg ttcgaaatg aaaggcgctc tcggctgtca cttatggatg
241 gaccgcgctc gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggaacc gatgocgtagc
301 cgacctgaga ggtgatcggc caacactggg actgagacac gcccagactc cctacgggag
361 gcacagtagt ggaatctccc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg
421 atgaaggctt tcgggtcgta aaactctgtt gttagggaag aacaagtgtc agttgaaata
481 gctggcaact tgacggtacc taaccagaaa gccacggcta actactgtcc agcagcccg
541 gtaataccta ggtggcaagc gttatccgga attattgggc gtaaacgctg cgcaggtggt
601 tcttaagtcg tgatgtgaaa gccacggctc caactcggga ggtcatctgg aaactgggag
661 actgagtgct agaagagaaa agtggaaatc catgtgtagc ggtgaaatgc gtatagatgt
721 ggaggaacac cagtggcgaa ggcgacttct tggctctgaa ctgacactga ggcgcgaaag
781 cgtgggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtcttaa
841 gtgttagagg gttccgccc tttagtctg aagttaacgc attaagcact ccgcctgggg
901 agtacggccg caaggctgaa actcaaaaga attgacgggg gcccgcaaaa gcggtgggagc
961 atgtggttta atcgaagca acggaagaa ccttaccagg tcttgcacac ccttgaaac
1021 cctagagata gggctctccc ttcgggagca gactgacagg ttgtgcatgg ttgtcgtcag
1081 ctgctgtcgt gagatgttgg gtaagctccc gcaacgagcg caaccttga caactgttgc
1141 catcattaag ttgggcactc taagtgactc gccgtgtgca aaccggagga aggtggggat
1201 gaagcaaat catcatgcc cttatgacct gggctacaca cgtgtacaaa tggacggtac
1261 aaagagctgc aagaccgaga ggtggagcta atctcataaa accgttctca agatcgatgt
1321 taggtgcaca ctgcctacaa tgaagctgga atcgctagta atcgcgatc agcatcgccg
1381 ggtgaatcag ttcocggccc ttgtacacac gcgccgtcac accacgagag tttgtaaac
1441 ccgaagtctg tgggtaaac ttttggagc cagccgctca aggtgggaca gatgatggg
1501 gtgaagtcgt aacaagtagt ccgtatcaga aggtgagcct ggatacactc ctttct
    
```

Рис. 1 - Анализ (А) и структура (Б) гена 16S ribosomal *Bacillus cereus* group

Job title: ref|NC\_004722.1| (5411809 letters)

RID: [9GR7K765014](#) (Expires on 03-03 03:05 am)

Query ID: [NC\\_004722.1](#)

Description: *Bacillus cereus* ATCC 14579 chromosome, complete genome

Molecule type: dna

Query Length: 1555

Database Name: nr

Description: Nucleotide collection (nt)

Program: BLASTN 2.8.0+

**Graphic Summary**



**Descriptions**

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Bacillus cereus</i> strain FORC60 chromosome, complete genome	2874	40162	100%	0.0	100%	<a href="#">CP020383.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain HBL-AI chromosome, complete genome	2874	40135	100%	0.0	100%	<a href="#">CP023245.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain M13, complete genome	2874	37335	100%	0.0	100%	<a href="#">CP016360.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain K6, complete sequence	2874	40143	100%	0.0	100%	<a href="#">CP016595.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain FORC_048, complete genome	2874	40176	100%	0.0	100%	<a href="#">CP017234.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain D12_2, complete genome	2874	40176	100%	0.0	100%	<a href="#">CP016315.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain A1, complete genome	2874	40143	100%	0.0	100%	<a href="#">CP015727.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain HN001, complete genome	2874	37268	100%	0.0	100%	<a href="#">CP011555.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain FORC021, complete genome	2874	40187	100%	0.0	100%	<a href="#">CP014486.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain FORC_013, complete sequence	2874	40204	100%	0.0	100%	<a href="#">CP011145.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain FORC_024, complete genome	2874	40165	100%	0.0	100%	<a href="#">CP012691.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain BC-AK genomic sequence	2868	35549	100%	0.0	99%	<a href="#">CP020937.1</a>
<i>Bacillus anthracis</i> strain SPV842_15, complete genome	2868	31457	100%	0.0	99%	<a href="#">CP019588.1</a>
<i>Bacillus anthracis</i> strain Tyrol 4675, complete genome	2868	31434	100%	0.0	99%	<a href="#">CP018903.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain AR156, complete genome	2868	37023	100%	0.0	99%	<a href="#">CP015589.1</a>
<i>Bacillus anthracis</i> str. A16R, complete genome	2868	31409	100%	0.0	99%	<a href="#">CP001974.2</a>
<i>Bacillus anthracis</i> str. A16, complete genome	2868	31457	100%	0.0	99%	<a href="#">CP001970.2</a>
<i>Bacillus anthracis</i> strain PR10-4, complete genome	2868	31457	100%	0.0	99%	<a href="#">CP012728.1</a>
<i>Bacillus anthracis</i> strain PR09-4, complete genome	2868	31457	100%	0.0	99%	<a href="#">CP012727.1</a>
<i>Bacillus anthracis</i> strain PR09-1, complete genome	2868	31457	100%	0.0	99%	<a href="#">CP012726.1</a>
<i>Bacillus anthracis</i> strain PR08, complete genome	2868	31457	100%	0.0	99%	<a href="#">CP012725.1</a>
complete genome, strain: Pasteur Institute Standard strain	2874	34438	100%	0.0	100%	<a href="#">AP014886.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> strain FORC_005, complete genome	2874	40148	100%	0.0	100%	<a href="#">CP009686.1</a>
<i>Bacillus mycoides</i> strain Ko01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2804	2804	98%	0.0	99%	<a href="#">KT098098.1</a>
<i>Bacillus cereus</i> O3BB102, complete genome	2874	40060	100%	0.0	100%	<a href="#">CP006318.1</a>
<i>Bacillus mycoides</i> partial 16S rRNA gene and ITS1, strain CIP-103472	2800	2800	98%	0.0	99%	<a href="#">AM747229.1</a>

Рис. 2 - Фрагмент сравнительного анализа гена 16S ribosomal представленных в NCBI штаммов *Bacillus cereus* group



**Рис. 3 - Фрагмент множественного выравнивания гена 16S ribosomal *Bacillus cereus* group**

рий, которые были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ: *Bacillus anthracis* СТИ-1, 55-ВНИИВВиМ, Шуя-15, Sterne 34 F2, 1007, 1190R, 104; 94; Ichtiman, «Девис», M-71; *Bacillus*

*mycoides* - 12 штаммов, *Bacillus cereus* – 106 штаммов; *Bacillus thuringiensis* – 3 штамма; *Bacillus subtilis* – 16 штаммов, *Bacillus megaterium* – 6 штаммов, *Bacillus pumilus* – 18 штаммов, *Bacillus coagulans* – 5 штаммов, *Paenibacillus polimixa* – 2 штамма, *Paenibacillus larvae* – 2 штамма, *Listeria*

*monocytogenes* – 3 штамма. Бактериальные культуры хранились в столбике 0,7 % мясо-пептонного агара, засеянного уколом, при температуре 2-4 °С.

Для подбора и оптимизации праймеров, специфичных в отношении изучаемых бактерий и бактериофагов, были использованы ресурсы NCBI: BLAST nucleotide и PRIMER BLAST. Систем праймеров и зондов осуществлялся методом химического концентрирования на приборе ASM-800 (фирма «Биоссет», г. Новосибирск) с использованием реагентов: мономеров (dA-CE фосфорамидид, dC(Bz) CE фосфорамидид, dG-CE фосфорамидид, dT-CE фосфорамидид), активатор 5- Ethylthio-1H-Tetrazole, полимеры CPG, колонки 100nmol/ 12 ul (dA, dC, dG, T). Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов EX 511 «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол», г. Москва), для постановки ПЦР применяли набор реагентов R-412 «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ», имеющий состав дезоксинуклеотидтрифосфаты - 2,5 мМ, 10-кратный ПЦР буфер, MgCl<sub>2</sub> – 25 мМ, Taq ДНК-полимераза с ингибирующей активностью фермента антителами-5 Е/мкл (ООО «Синтол», г. Москва).

#### Результаты исследований

Так как к «группе *Bacillus cereus*» относят виды *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus weihenstephanensis*, то сравнение и разработка системы индикации была проведена с использованием данных геномов, доступных для изучения в системе NCBI. Сначала была определена

позиция и полный нуклеотидный состав гена 16S ribosomal «группы *Bacillus cereus*» (рис. 1).

Затем с использованием ресурсов NCBI Blast nucleotide было проведено прямое сравнение исследуемого гена у всех доступных для изучения штаммов к «группе *Bacillus cereus*». В итоге проведенного сравнения были получены данные о 99% совпадении нуклеотидного состава исследуемого гена у всех, доступных для исследования, штаммов «группы *Bacillus cereus*» (рис. 2).

Далее с помощью ПО UGENE было проведено множественное выравнивание гена 16S ribosomal для выявления консервативных участков, которые могут быть использованы при дизайне праймеров при индикации бактерий «группы *Bacillus cereus*» (рис. 3). После определения консервативных регионов для данных фрагментов были определены олигонуклеотиды, способные специфически связываться с представителями всей «группы *Bacillus cereus*» (рис. 4).

В результате ряда проведенных экспериментов по оптимизации были определены параметры постановки полимеразно-цепной реакции, при которой наблюдается амплификация максимального количества специфического продукта реакции: температура отжига праймеров – 60°C, а их количество – по 8 пмоль/реакцию.

При использовании 15 референс и 117 выделенных из окружающей среды штаммов

PrimerID	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Primer_Quality(%)	Fragment_Size(bp) / Tm(°C)	Topt(°C)
1F26_1_366-389	agtagggaatcttccgcaatggac	58,3	95		
1R37_1_1149-1171	cagtacacctagagtgcccaact	58,0	90	806/85	65
1F26_1_366-389	agtagggaatcttccgcaatggac	58,3	95		
1R82_1_628-648	aatgaccctccacggttgagc	58,8	90	283/84	64
1F26_1_366-389	agtagggaatcttccgcaatggac	58,3	95		
1R13_1_1357-1378	ggcatgctgatcccgattact	59,5	90	1013/86	65
1F26_1_366-389	agtagggaatcttccgcaatggac	58,3	95		
1R93_1_490-513	ggcttctggttaggtaccgtcaa	58,4	89	148/80	63
1F20_1_278-298	tcaccaaggcaacgatgcgta	58,5	91		
1R103_1_377-399	tcagacttctgctcattgcggaa	58,3	93	122/83	63
1F26_1_366-389	agtagggaatcttccgcaatggac	58,3	95		
1R87_1_553-577	caataattccggataacgcttgcca	58,0	88	212/82	63
1F39_1_476-497	aataagctggcaccttgacggt	58,2	93		
1R82_1_628-648	aatgaccctccacggttgagc	58,8	90	173/82	63
<b>1F37_1_538-557</b>	<b>GCGGTAATACGTAGGTGGCA</b>	<b>59,9</b>	<b>93</b>		
<b>1R37_1_809-828</b>	<b>GTTTACGGCGTGGACTACCA</b>	<b>60,0</b>	<b>90</b>	<b>291/85</b>	<b>60</b>
1F39_1_476-497	aataagctggcaccttgacggt	58,2	93		
1R13_1_1357-1378	ggcatgctgatcccgattact	59,5	90	903/86	65
1F37_1_466-489	gtgctagttgataaagctggcacc	58,4	93		
1R82_1_628-648	aatgaccctccacggttgagc	58,8	90	183/83	64

Рис. 4 - Варианты праймерных систем для амплификации фрагмента гена 16S ribosomal *Bacillus cereus* group (пунктиром выделена пара олигонуклеотидов, которая была использована в дальнейших исследованиях)

исследуемой «группы *Bacillus cereus*» была проведена валидация ПЦР.

#### Выводы

В результате проведенных исследований были подобраны специфические праймеры на основе гена 16S рРНК для бактерий «группы *Bacillus cereus*» GCGGTAATACGTAGGTGGCA-GTTTACGGCGTGGACTACCA и параметры постановки полимеразно-цепной реакции с детекцией «в режиме реального времени» со специфическими праймерами (температура отжига на матрице 60°C, количество праймеров – 8 пмоль).

Для апробации праймерной системы и параметров постановки ПЦР РВ были проведены исследования по идентификации музейных штаммов *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. Установлена принадлежность вышеназванных штаммов бактерий к «группе *Bacillus cereus*». Первичная дифференциация представителей рода *Bacillus*, проведенная в течение 2,5 - 3,0 часов, позволит исследователям разработать оптимальный алгоритм действий для дальнейшей идентификации, так как методика бактериологического типирования опирается на схему идентификации представителей первой морфологической группы по R. Gordon (1973) («Ключ для определения типичных штаммов видов рода *Bacillus*»), которая до настоящего времени является основой видовой идентификации вышеназванных микроорганизмов, описанной в «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (2015) [11-14].

#### Библиографический список

1. *Bacillus anthracis* Diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes / A. Cerif, S. Borin, A.A. Pizzi [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, №1. – P. 33-40.

2. Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бацилл / Е.И. Еременко, О.И. Цыганкова, А.Г. Рязанова [и др.] // Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. - 2009. - № 3. - С. 76–80.

3. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera / D. Daffonchio, A. Cherif, L. Brusetti, A. Rizzi, D. Mora, A. Boudabous [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. - № 69. – P. 5128-5137.

4. Идентификация бактерий *Bacillus cereus*

на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова [и др.]. – Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – С. 24.

5. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis* / R. Easterday, M. Van Ert, T. Simonson, D. Wagner, L. Kenefic, C. Allender, P. Keim // J. Clin. Microbiol. - 2005. - V.43 (4). - P.1995-1997.

6. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group / A. Fagerlund, J. Brillard, R. Fürst, M.H. Guinebretière, P.E. Granum // BMC Microbiol. – 2007. - № 7. – P. 43.

7. Contzen, M. Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products / M. Contzen, M. Hailer, J. Rau // International Journal of Food Microbiology. – 2014. - № 174. – P.19–22.

8. Heral, V. *Bacillus cereus* as a cause of alimentary intoxication / V. Heral // Cesk Hyg. – 2013. –№ 8. – P.303-307.

9. BLAST+: architecture and applications / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2009. - № 10. – P. 421.

10. Ефимочкина, Наталья Рамозановна. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. ... канд. биологических наук: 14.02.01 / Н.Р. Ефимочкина. – Москва, 2010. – 28с.

11. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In: Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio). - 1973. - V.1. - P.71–88.

12. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [Электронный ресурс] / William B. Whitman, Paul DeVos, Jonsik Chun, Svetlana Dedysh, Brian Hedlund, Peter Kämpfer, Fred Rainey, Martha Trujillo. - Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118960608.gbm00530>. – дата обращения 12.07.2018.

13. Бактериофаги рода *Bacillus*: биология и практическое применение / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск, 2017. -112 с.

14. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин, К.В. Белова // Сборник материалов III Международного форума БИОКИРОВ – 2015. – Киров, 2015. - С. 10-12.

## SELECTION OF SPECIFIC PRIMERS BASED ON 16S rRNA GENE FOR BACILLUS CEREUS BACTERIA

Feoktistova N.A., Vasiliev D.A., Mastilenko A.V.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk, Novyy Venets Boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

**Key words:** *Bacillus cereus* group, primers, parameters, PCR RV, method, identification

The article presents results of studies on the selection of specific primers based on 16S rRNA gene for bacteria of "Bacillus cereus group", which includes species of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus weihenstephanensis* (the gene structure was determined, as well as conservative regions of the given gene represented in the NCBI system (BLAST nucleotide and PRIMER BLAST) of the strains of the above groups, multiple gene alignment and primer selection were performed). Synthesis of primers and probes was performed by chemical concentration method on ASM-800 instrument (Biosset, Novosibirsk). Oligonucleotides that can specifically bind to representatives of the entire "Bacillus cereus group" are GCGGTAATACGTAGGTGGCA-GTTTACGGCGTGGACTACCA. As a result of a series of improvement experiments, the parameters of the polymerase chain reaction were determined, at which the maximum amount of specific reaction product was amplified: annealing temperature of the primers was 60 °C, and their number was 8 pmol / reaction. PCR validation was performed with application of 16 reference and 116 isolates from the environment of the studied "Bacillus cereus group". As a result, 132 strains were identified as representatives of "Bacillus cereus group". The real-time detection of PCR with application of primers specific for the representatives of "Bacillus cereus group" is recommended as a method of primary identification of the above bacteria and a method of indication in the objects of veterinary and sanitary supervision, its sensitivity is 102-103 µ.k / g.

### Bibliography

1. *Bacillus anthracis* Diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes / A. Cerif, S. Borin, A.A. Pizzi et al., *Appl. Environ. Microbiol.* - 2003. - Vol. 69, No. 1. - P. 33-40.
2. Improvement of identification methods of atypical strains of the causative agent of anthrax and their differentiation from closely related bacilli / E.I. Eremenko, O.I. Tsygankova, A.G. Ryazanov [et al.] // *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology.* - 2009. - No. 3. - P. 76-80.
3. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera / D. Daffonchio, A. Cherif, L. Brusetti, A. Rizzi, D. Mora, A. Boudabous [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2003. - No. 69. - P. 5128-5137.
4. Identification of *Bacillus cereus* bacteria on the basis of their phenotypic characteristics / D.A. Vasiliev, A.I. Kaldyrkaev, N.A. Feoktistova [et al.]. - Ulyanovsk: USAA named after P.A. Stolypin, 2013. - P. 24.
5. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis* / R. Easterday, M. Van Ert, T. Simonson, D. Wagner, L. Kenefic, C. Allender, P. Keim // *J Clin. Microbiol.* - 2005. - V.43 (4). - P.1995-1997.
6. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group / A. Fagerlund, J. Brillard, R. Fürst, M.H. Guinebretière, P.E. Granum // *BMC Microbiol.* - 2007. - No. 7. - P. 43.
7. Contzen, M. Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products / M. Contzen, M. Hailer, J. Rau // *International Journal of Food Microbiology.* - 2014. - No. 174. - P.19-22.
8. Heral, V. *Bacillus cereus* as a cause of alimentary intoxication / V. Heral // *Cesk Hyg.* - 2013.-No. 8. - R.303-307.
9. BLAST+: architecture and applications / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer [et al.] // *BMC Bioinformatics.* - 2009. - No. 10. - P. 421.
10. Efimochkina, Natalia Ramazanovna. New bacterial pathogens in food products: experimental substantiation and development of a control system using the methods of microbiological and molecular genetic analysis: the author's abstract of dissertation of Candidate of Biological Sciences: 14.02.01 / N.R. Efimochkina. - Moscow, 2010. - 28p.
11. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In: *Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio).* - 1973. - V.1. - P.71-88.
12. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [Electronic resource] / William B. Whitman, Paul DeVos, Jonsik Chun, Sveltiana Dedysh, Brian Hedlund, Peter Kämpfer, Fred Rainey, Martha Trujillo. - Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015. - URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118960608.gbm00530>. - access date 12.07.2018.
13. Bacteriophages of *Bacillus* genus: biology and practical application / N.A. Feoktistova, A.I. Kaldykayev, D.A. Vasiliev [et al.]. - Ulyanovsk, 2017. -156 p.
14. Isolation of bacteriophages specific for *Bacillus anthracis* / E.I. Klimushkin, N.A. Feoktistova, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin, A.V. Aleshkin, K.V. Belova // *Collected materials of the III International Forum BIOKIROV* - 2015. - Kirov, 2015. - P. 10-12.