

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГА PHAGUM B.C. 11 УГСХА

Мартынова Ксения Вячеславовна, соискатель кафедры «Микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: belova_ksenya@mail.ru

Ключевые слова: *Bacillus coagulans*, бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА, биологические свойства, молекулярно-генетическая характеристика, биопрепарат.

В статье представлены результаты исследований по изучению биологических свойств бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА. Биоинформационные данные сиквенса *Bacillus coagulans* phage Phagum B.c. 11 УГСХА: длина: 42609 bp, содержание GC: 37,1 %, молекулярный вес: 27 014 203,97 Da, молярность 1 мкг/мкл раствора: 0.04 мкм, количество молекул в 1 мкг: 2.23×10^{10} , А 260 из 1 мкг/мкл раствора после 100-кратного разведения: 0,259. Экспериментально были подобраны технологические параметры культивирования системы фаг/хозяин (0,2 мл бактериофага к 0,2 мл индикаторной культуры *B. coagulans*), время пассажа - 6 часов при температуре культивирования - $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Для очистки Phagum B.c. 11 УГСХА рекомендовано использовать мембранные фильтры фирмы Millipore 0,22 мкм GV. Определено, что литическая активность по Аппельману составила 10^9 , по Грация показатель равен $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ (БОЕ/мл); Phagum B.c. 11 УГСХА обладал строгой специфичностью по отношению к штаммам *B. coagulans*; морфология бляшкообразующих единиц (округлая форма с прозрачным центром, зоны неполного лизиса, диаметр 1-4 мм, вторичного роста не наблюдалось). Эмпирически установлено, что Phagum B.c. 11 УГСХА не терял литической активности спустя 3 месяца при хранении при температуре $2-4^\circ\text{C}$, а через 12 месяцев показатель снижался до 10^8 .

Изученные биологические свойства бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА, выделенного из свежего томата с признаками порчи, специфичного для 46 из 50 бактериальных штаммов *Bacillus coagulans*, позволяют рекомендовать Phagum B.c. 11 УГСХА для изготовления фагового биопрепарата, применяемого не только в лаборатории в целях индикации и идентификации специфичных ему бактерий *Bacillus coagulans*, но и для деконтаминации пищевого сырья и продовольственных товаров, профилактики пищевых отравлений, так как данные проведенного нами генетического и протеомного картирования позволяют сделать вывод о том, что бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА не содержит локусов патогенности и их гомологов.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2019 году.

Введение

Бактерии вида *Bacillus coagulans* благодаря высоким адаптивным возможностям имеют широкое распространение как в воздухе, так и в почве, так же заражению ими подвергаются продукты питания, сырье и материалы, которые используют для их изготовления. Бактерии данного вида, выделяя токсины, вызывают болезни растений, и как следствие этого, развивается

порча как самого сырья, так и готовой продукции [1-2]. Чаще всего плодовоовощные консервы подвержены плоско-кислой порче, при которой слабо выражены внешние изменения продукта и отсутствуют какие-либо изменения банки, но при этом токсины могут содержаться в этих консервах. Человек, употребивший такой продукт, может отравиться этими токсинами, так же токсины негативно воздействуют и на животный

организм, в итоге пораженный продукт подлежит только уничтожению [3-5]. Однако, есть сообщения ученых, где описаны патологические процессы у теплокровных, вызываемые *Bacillus coagulans* [1, 6, 7],

Предприятия, занимающиеся производством консервной продукции, могут избежать материальных потерь, так же не стать распространителями массовых отравлений данными продуктами благодаря использованию при изготовлении овощных и мясорастительных консервов биопрепарата на основе бактериофага [8-9]. Главная особенность биопрепарата на основе фагов заключается в том, что он не влияет ни на сам продукт, ни на организм человека, а связано это с тем, что бактериофаг – это вирус, который активизируется только тогда, когда есть искомая микрофлора, если её нет, то активации бактериофага не происходит [10].

Цель работы – изучить биологические свойства бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА, включая его молекулярно-генетическую характеристику.

Для осуществления поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- изучить морфологию бляшкообразующих единиц;
- провести эксперименты по определению показателей литической активности;
- установить спектр литического действия;
- определить специфичность действия;
- проанализировать характер 30-ти минутного влияния на бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА температуры в диапазоне 45-90 °C и 5-15 минутного воздействия трихлорметана в соотношении 1:10;
- дать молекулярно-генетическую характеристику.

Объекты и методы исследований

Объекты исследования - свежие томаты с признаками порчи. Штаммы *Bacillus coagulans*: 566, 732, 948, 2770, 3042, 4521, 6668, 10268, 10468, 10473 из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ; *Bacillus thuringiensis* 2 штамма, *Bacillus megaterium* - 2, *Bacillus anthracis* - 4, *B. subtilis* - 6, *Bacillus. mesentericus (pumilus)* - 8, *Bacillus mycoides* - 12, *Bacillus. cereus* - 50; 40 штаммов бактерии *Bacillus coagulans*, выделенные нами в рамках научных исследований из проб пищевого сырья и продуктов питания и идентифицированные по Bergey's [11].

Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств осуществляли, используя методы Отто, Грациа, Аппельмана [10-16], опро-

бированные сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [12-14].

Методом метагеномного секвенирования осуществляли получение полногеномных нуклеотидных последовательностей выделенного бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА, так же подтверждали отсутствие лизогении индикаторного бактериального штамма *B. coagulans* 10268. Используя набор K-Сорб (ООО «НПФ Синтол», Россия), выделяли ДНК бактериофага по протоколу, рекомендованному производителем. У исследуемого бактериофага определяли нуклеотидные последовательности, используя полупроводниковое секвенирование на платформе Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, США). Прибором Bioanalyzer 2100 и набором реагентов Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США) осуществляли оценку распределения длин фрагментов библиотек и их концентрацию, используя протокол производителя. Клональная амплификация библиотек осуществлялась предварительно эквимолярно, была пулирована и проводилась с использованием набора Ion PI Template OT2 200 Kit v3 (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу рекомендованному производителем. Используя наборы реагентов Ion PI Sequencing 200 Kit v3 на чипе Ion PI Chip Kit v2 секвенатора Ion Proton (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя проводили секвенирование. Применяя программное обеспечение BLAST Ring Image Generator (BRIG) проводили визуализацию выравнивания собранных геномов с известными. Программным обеспечением UGENE (Унипро, Россия) проводили поиск открытых рамок считывания. Жизненный цикл бактериофага (вирулентный или умеренный) изучали с помощью программы PHACTS (San Diego State University, США). Используя алгоритм blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) определяли потенциально умеренный бактериофаг или подтверждали его вирулентность в ходе определения отсутствия или наличия генов, которые кодируют известные интегразы, репрессоры транскрипции или их гомологи. Программным обеспечением BASys (Bacterial Annotation System) (<https://www.basys.ca>) осуществляли визуализацию аннотированного генома.

Исследования были проведены автором самостоятельно под научным руководством д.б.н., профессором Д.А. Васильевым и к.б.н., доцентом Н.А. Феоктистовой (ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ).

Результаты исследований

Бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА был выделен из свежего томата с признаками порчи. Выделение бактериофага проводили следующим образом: кусочек томата измельчали в ступке и разводили в мясопептонном бульоне (МПБ) в соотношении 1:10, в полученное содержимое добавляли по 1,0 мл бактериальных штаммов *B. coagulans*, ставили в термостат на 24 часа при температуре $35\pm 2^\circ\text{C}$. Инкубированное содержимое фильтровали ватно-марлевым фильтром для очищения его от механических примесей. Затем для устранения остатков бактериальной массы осуществляли 30 минутное центрифугирование этого фильтрата при 3000 об./мин. Пока осуществлялось центрифугирование, делали газон на чашках Петри с мясопептонным агаром (МПА), используя индикаторные суточные культуры *B. coagulans*. После подсушивания газона в течение 35-40 минут в условиях термостата исследовали центрифугат на наличие в нём фага. Для этого методом Отто («дорожки») делали посев на газон бактериальной культуры, при этом центрифугат наносили только на половину газона. Другую часть газона использовали для контроля и наносили на неё стерильный МПБ. Этот процесс осуществляли для подтверждения наличия необходимого бактериофага только в изучаемом субстрате. Чашки с посевами ставили на 18 часов в термостат при $35\pm 2^\circ\text{C}$. Зона лизиса культуры в виде «дорожки» (рис. 1) указывала на то, что в исследуемой пробе присутствует искомый бактериофаг.

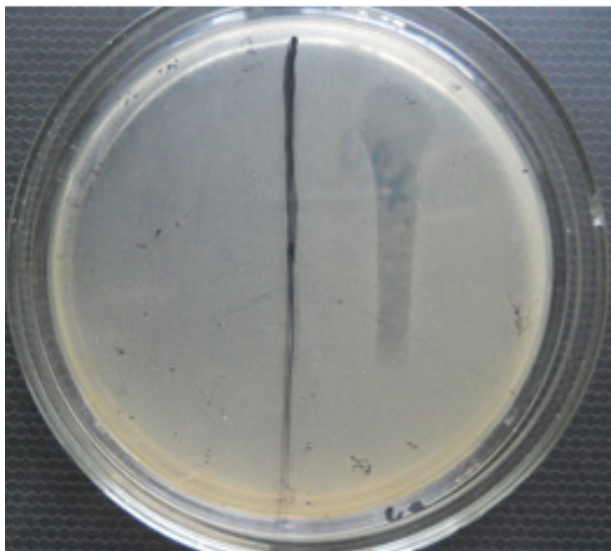


Рис. 1 – Искомый бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА на газоне культуры *B. coagulans* 10268

Очистка и селекция бактериофага. Стерильным МПБ заливали чашку с бактериальным газоном и бляшкообразующими единицами фага, далее стерильным стеклянным шпателем аккуратно счищали верхний слой МПА с диффундировавшим в него бактериофагом. Стерильной пипеткой собирали с чашки Петри полученное содержимое, сливали его в чистую пробирку и затем проводили его очищение от бактериальных клеток мембранными фильтрами фирмы Millipore (0,22 мкм).

Алгоритм 10-ти кратного пассирования бактериофага: в одну пробирку с 4,5 мл МПБ добавляли бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА в количестве 0,2 мл и в неё же вносили 18-часовую индикаторную культуру *B. coagulans* 10268 0,2 мл, в другую пробирку (контрольную) засевали только 18-часовую индикаторную культуру *B. coagulans* 0,2 мл. Пробирки с полученными посевами ставили в термостат, содержащий температуру $35\pm 2^\circ\text{C}$, время культивирования завершали тогда, когда в контрольной пробирке наблюдали рост индикаторной культуры (пленка на поверхности МПБ). В отличие от контрольного посева, опытный посев должен был быть прозрачным и без пленки на поверхности [15]. Было визуально зафиксировано, что в контрольном посеве рост бактериальной культуры проявлялся через 6 часов термостатирования при температуре $35\pm 2^\circ\text{C}$.

Оптимальное соотношение бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА и индикаторного штамма *B. coagulans* 10268 определяли, используя несколько соотношений фага и культуры, такие как 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. С помощью этого исследования было установлено, что оптимальное соотношение – это 1:1 (0,2 мл бактериофага к 0,2 мл индикаторной культуры *B. coagulans*.).

Изучение литической активности бактериофага проводили, используя классические методы Аппельмана и Грация [10-13]. Эмпирически установлено, что выделенный бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА имел литическую активность по Аппельману 10^{-9} , а по Грация $4,0\pm 0,1\times 10^{10}$ (БОЕ/мл).

Основная биологическая характеристика бактериофага – диапазон лизиса гомологичных к фагу бактерий, данное свойство используют для идентификации бактерий [4, 6]. Для определения спектра литического действия изучаемого бактериофага использовали 40 полевых штаммов и 10 референс-штаммов бактерий *B. coagulans*. Определено, что показатель составил 92% на 50 штаммах.

Затем изучали специфичность бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА в пределах вида. В результате исследования установили, что данный фаг обладал строгой специфичностью по отношению к бактериальным штаммам *B. coagulans* и не лизировал бактерии гомологичного рода: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthracis*, *B. subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*.

Морфология бляшкообразующих единиц фага Phagum B.c. 11 УГСХА: округлая форма с прозрачным центром, зоны неполного лизиса, диаметр 1-4 мм, вторичного роста не наблюдалось (рис. 2).

Изучение влияния температурного фактора (30-ти минутное воздействие температуры в диапазоне 45-90 °С с интервалом в 5 °С) и химических веществ (на примере трихлорметана) позволило бы подобрать дополнительный метод очистки фагов от бактериальных клеток. В результате исследований было определено, что бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА и индикаторная культура *B. coagulans* 10268 не устойчивы к температурному воздействию, поэтому данный способ очистки применять не следует.

Затем проводили обработку фага Phagum B.c. 11 УГСХА и индикаторной культуры *B. coagulans* 10268 трихлорметаном, который в большинстве случаев оказывает губительное воздействие на бактерии [11, 12]. В результате индикаторные культуры *B. coagulans* смогли выдержать только пятиминутную экспозицию с трихлорметаном, а фаг Phagum B.c. 11 УГСХА выдержал воздействие трихлорметана в течение 15 минут. В связи с длительным и трудоемким способом очистки данным методом, нами было решено отказаться от этого способа очистки бактериофага.

Проанализировав результаты проведенных исследований, становится ясно, что для очистки фаголизата от бактерий *Bacillus coagulans* лучше использовать мембранные фильтры фирмы Millipore 0,22 µm GV в связи с их быстрой постановкой и эффективным результатом в отличие от применения трихлорметана [14, 17].

Бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА культивировали на коммерческом мясопептонном бульоне с индикаторной культурой *Bacillus coagulans* 10268, которая хранилась в пробирке на полужидком МПА, pH которого составлял 7,2-7,4 и содержал 0,3% бактериологического агара, температура хранения - 2-4°С, пересев бактериальной культуры - 1 раз в 4 месяца. Перед использованием производственного штамма

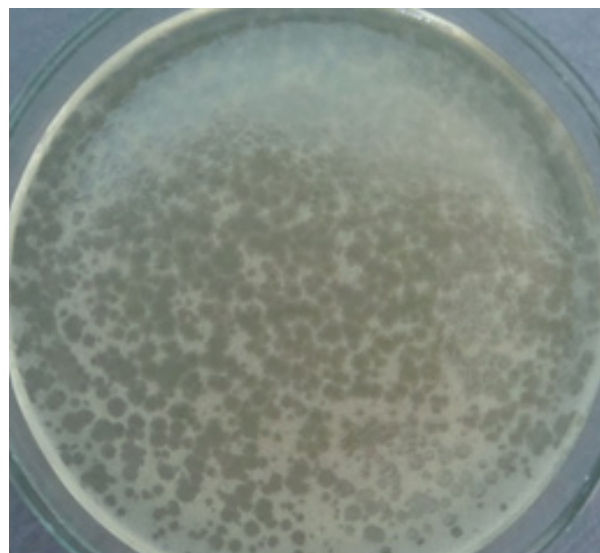


Рис. 2 – Бляшкообразующие единицы бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА

Bacillus coagulans 10268 не реже одного раза в 6 месяцев проводили проверку типичности его тинкториальных, морфологических, культуральных биохимических свойств.

Бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА хранили в холодильнике 12 месяцев и в течение этого времени проводили проверку изменения его литической активности по классической методике, используя метод Грациа. Установлено, что в течение 3 месяцев показатели остались прежними $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ бляшкообразующих единиц в 1 мл фаголизата, через 6 месяцев - $6,0 \pm 0,1 \times 10^9$ бляшкообразующих единиц в 1 мл фаголизата, спустя 9 месяцев - $5,0 \pm 0,1 \times 10^8$ бляшкообразующих единиц в 1 мл фаголизата, через 12 месяцев - $3,0 \pm 0,1 \times 10^8$ бляшкообразующих единиц в 1 мл фаголизата. Было эмпирически установле-

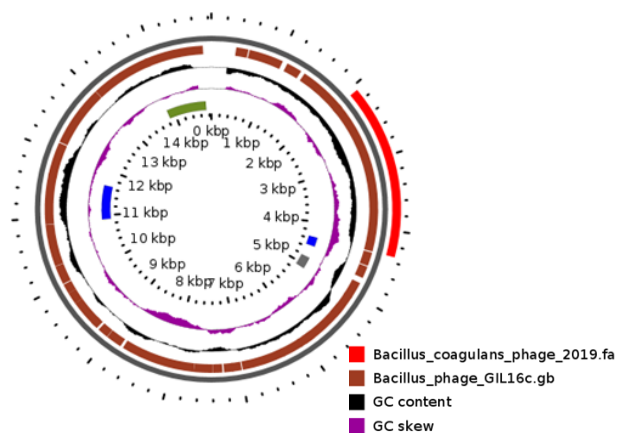


Рис. 3 – Сравнительный анализ гомологии геномов исследуемого бактериофага *Bacillus coagulans* Phagum B.c. 11 УГСХА и *Bacillus phage* GIL16c

Таблица 1

Сравнительный анализ генома Phagum В.с. 11 УГСХА с данными геномов, представленных в системе NCBI

Микроорганизм, фрагмент генома	Кол-во совпад. п.н.	Общее кол-во п.н. микро-ма, фрагмента генома	% совпадения	E value	% идентичности фрагмента	Код микроорга-низма в базе NCBI
<i>Bacillus thuringiensis</i> phage GIL16c, complete genome	27401	27401	34%	0.0	100.00%	AY701338.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMBLin15, complete sequence	27231	27317	34%	0.0	99.83%	CP004882.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki strain HD 1 plasmid unnamed9 sequence	27143	27143	34%	0.0	99.84%	CP010012.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain YC-10 plasmid pYC10, complete sequence	17834	17834	22%	0.0	99.79%	CP011355.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar galleriae strain HD-29 plasmid pBMBLin15, complete sequence	15191	22323	33%	0.0	97.04%	CP010096.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain 2002013094, complete genome	14482	88202	52%	0.0	99.97%	CP009902.1
<i>Bacillus anthracis</i> phage Gamma isolate 53, complete genome	14482	41072	52%	0.0	99.99%	DQ222855.1
<i>Bacillus anthracis</i> phage Gamma isolate 51, complete genome	14482	39305	49%	0.0	99.99%	DQ222853.1
<i>Bacillus anthracis</i> bacteriophage Fah, complete sequence	14482	41093	52%	0.0	99.99%	DQ150593.1
Bacteriophage bacillus	14482	39132	49%	0.0	99.99%	DQ221100.2
<i>Bacillus anthracis</i> phage Cherry, complete genome	14475	39300	49%	0.0	99.96%	DQ222851.1
<i>Bacillus anthracis</i> phage W Beta, complete genome	13291	39881	51%	0.0	98.41%	DQ289555.1
<i>Bacillus anthracis</i> phage Gamma isolate d'Herelle, complete genome	12914	37721	49%	0.0	97.51%	DQ289556.1
<i>Bacillus cereus</i> strain JEM-2, complete genome	12205	17766	28%	0.0	94.76%	CP018935.1
<i>Bacillus cereus</i> strain ISSFR-9F, complete genome	12205	17766	28%	0.0	94.76%	CP018933.1
<i>Bacillus cereus</i> strain ISSFR-3F, complete genome	12205	17766	28%	0.0	94.76%	CP018931.1
<i>Bacillus</i> phage AP631, complete genome	12118	31313	45%	0.0	95.54%	MK085976.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HD1011, complete genome	11513	18081	29%	0.0	94.20%	CP009335.1
<i>Bacillus cereus</i> D17, complete genome	11459	48090	46%	0.0	94.12%	CP009300.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain XL6, complete genome	10641	23058	30%	0.0	92.28%	CP013000.1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 4342, complete genome	10630	15579	27%	0.0	92.12%	CP009628.1
<i>Bacillus</i> sp. SY1 chromosome, complete genome	10536	15505	27%	0.0	91.84%	CP036356.1
<i>Bacillus cereus</i> strain AR156, complete genome	10475	15534	27%	0.0	91.70%	CP015589.1
<i>Bacillus tropicus</i> strain LM1212-W3 chromosome, complete genome	9954	14052	27%	0.0	90.36%	CP041071.1
<i>Bacillus cereus</i> strain AR156, complete genome	10475	15534	27%	0.0	91.70%	CP015589.1
<i>Bacillus tropicus</i> strain LM1212-W3 chromosome, complete genome	9954	14052	27%	0.0	90.36%	CP041071.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> LM1212 chromosome, complete genome	9954	14052	27%	0.0	90.36%	CP024771.1
Uncultured Caudovirales phage clone 9AX_2, partial genome	9585	14385	28%	0.0	88.74%	MF417893.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain MCCC 1A02161 chromosome, complete genome	9577	18873	30%	0.0	94.76%	CP031642.1
<i>Bacillus</i> sp. FDAARGOS_527 chromosome, complete genome	8154	18667	26%	0.0	90.59%	CP033795.1
<i>Bacillaceae</i> bacterium C05 chromosome, complete genome	8131	19180	29%	0.0	90.52%	CP045537.1
<i>Bacillaceae</i> bacterium C02 chromosome, complete genome	7239	14478	28%	0.0	87.93%	CP045533.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain JW-1 plasmid p5, complete sequence	6722	16595	30%	0.0	92.57%	CP045027.1
<i>Bacillus</i> phage pGIL02, complete sequence	6722	16595	30%	0.0	92.57%	CP013282.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD1002 plasmid 5, complete sequence	6722	16595	30%	0.0	92.55%	CP009346.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789 plasmid pBTHD789-4, complete sequence	6722	16595	30%	0.0	92.57%	CP003767.1
<i>Bacillus</i> phage pGIL01, complete genome	6722	16595	30%	0.0	92.57%	AJ536073.2
<i>Bacillus thuringiensis</i> bacteriophage Bam35c, complete genome	6700	16573	30%	0.0	92.49%	AY257527.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar morrisoni strain BGSC 4AA1, complete genome	6399	32666	44%	0.0	92.45%	CP010577.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain L-7601, complete genome	6394	50571	44%	0.0	92.43%	CP020002.1
<i>Bacillus paranthracis</i> strain PR1 chromosome, complete genome	5746	12335	25%	0.0	88.12%	CP040515.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain c25, complete genome	5042	12403	28%	0.0	85.47%	CP022345.1
<i>Bacillus cereus</i> B4264, complete genome	5025	12376	28%	0.0	85.41%	CP001176.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain SCG04-02, complete genome	5003	11089	26%	0.0	85.33%	CP017577.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain MCCC 1A01412 chromosome, complete genome	4726	8569	17%	0.0	88.51%	CP031643.1
<i>Bacillus anthracis</i> phage Gamma collagen region, complete sequence	4229	4229	5%	0.0	100.00%	DQ222854.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar tolworthi plasmid pKK6 DNA, complete genome, strain: Pasteur Institute Standard strain	4226	8163	16%	0.0	91.38%	AP014870.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518, complete genome	4117	23120	28%	0.0	82.08%	CP005935.1
<i>Bacillus cereus</i> strain HBL-AI chromosome, complete genome	3965	8070	25%	0.0	82.17%	CP023245.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar coreanensis strain ST7, complete genome	3956	18590	26%	0.0	82.16%	CP016194.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_23 chromosome, complete genome	3855	10327	28%	0.0	82.25%	CP024104.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_25 chromosome, complete genome	3855	10327	28%	0.0	82.25%	CP024101.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> NVH 391-98, complete genome	3843	10001	27%	0.0	82.20%	CP000764.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_2 chromosome, complete genome	3832	9802	27%	0.0	82.16%	CP024116.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_3 chromosome, complete genome	3832	9802	27%	0.0	82.16%	CP024113.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_4 chromosome, complete genome	3832	9802	27%	0.0	82.16%	CP024111.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_13 chromosome, complete genome	3832	9802	27%	0.0	82.16%	CP024109.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_15 chromosome, complete genome	3832	9802	27%	0.0	82.16%	CP024107.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_38 chromosome, complete genome	3832	9857	27%	0.0	82.16%	CP024098.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> strain CH_39 chromosome, complete genome	3832	9802	27%	0.0	82.16%	CP024096.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain H518-1, complete genome	3362	11976	26%	0.0	85.88%	CP012099.1
<i>Bacillus paranthracis</i> strain CF5AN068816 chromosome, complete genome	2796	4539	11%	0.0	82.50%	CP045777.1
<i>Bacillus</i> phage vB_BceS-MY192, partial genome	2796	4539	11%	0.0	82.50%	KT725776.1
<i>Bacillus</i> phage PFEFR-5, complete genome	2791	4534	11%	0.0	82.46%	KX227760.1
<i>Bacillus</i> phage PFEFR-4, complete genome	2791	4534	11%	0.0	82.46%	KX227757.1
<i>Bacillus</i> virus PBS1, complete genome	2717	9839	6%	0.0	99.86%	NC_043027.1
<i>Bacillus</i> virus PBS1, complete genome	2717	4919	6%	0.0	99.86%	MF360957.1
<i>Bacillus</i> phage AR9, complete genome	2717	4919	6%	0.0	99.86%	KJ878088.1
<i>Bacillus</i> phage BtiUFT6.51-F, complete genome	2662	8810	23%	0.0	84.67%	MG710484.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bc601, complete genome	2662	27911	26%	0.0	84.67%	CP015150.1
<i>Bacillus</i> phage phi411, complete genome	2662	8810	23%	0.0	84.67%	KT967075.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain YWC2-8, complete genome	2662	27911	26%	0.0	84.67%	CP013055.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain YC-10, complete genome	2662	27911	26%	0.0	84.67%	CP011349.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar tolworthi DNA, complete genome, strain: Pasteur Institute Standard strain	2662	20500	27%	0.0	84.67%	AP014864.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki strain HD 1, complete genome	2662	27911	26%	0.0	84.67%	CP010005.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str. YBT-1520, complete genome	2662	26506	27%	0.0	84.67%	CP004858.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str. YBT-1520, complete genome	2656	27451	27%	0.0	84.64%	CP007607.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain JW-1 chromosome, complete genome	2593	11251	25%	0.0	85.64%	CP045030.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BT-59 chromosome, complete genome	2593	11251	25%	0.0	85.64%	CP039721.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis strain AM65-52, complete genome	2593	11251	25%	0.0	85.64%	CP013275.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD1002, complete genome	2593	11251	25%	0.0	85.64%	CP009351.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789, complete genome	2593	11251	25%	0.0	85.64%	CP003763.1
<i>Bacillus</i> phage phiS3501, complete genome	2593	10375	25%	0.0	85.64%	JQ062992.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str. HD73, complete genome	2569	29293	26%	0.0	85.91%	CP004069.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain YGd22-03, complete genome	2566	10358	27%	0.0	85.44%	CP019230.1
<i>Bacillus</i> phage BtCS33, complete genome	2553	7706	20%	0.0	85.79%	JN191664.1
<i>Bacillus</i> phage phiCM3, complete genome	2525	8478	23%	0.0	85.58%	KF296718.1
<i>Bacillus wiedmannii</i> by. <i>thuringiensis</i> strain FCC41 chromosome, complete genome	2508	4419	7%	0.0	83.60%	CP024684.1
<i>Bacillus anthracis</i> CZC5 DNA, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	AP018443.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain London_499 chromosome, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP029805.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain 14RA5914, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP023001.1
<i>Bacillus anthracis</i> str. A16R, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP001974.2
<i>Bacillus anthracis</i> str. A16, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP001970.2
<i>Bacillus anthracis</i> strain Stendal, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP014179.1
<i>Bacillus anthracis</i> DNA, nearly complete genome, strain: Shikan-NIID	2486	6181	10%	0.0	86.88%	AP014833.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain A1144, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP010852.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain Canadian_bison, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP010322.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain Ames, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP009981.1
<i>Bacillus anthracis</i> str. V770-NP-1R, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP009598.1
<i>Bacillus anthracis</i> strain BA1015, complete genome	2486	6181	10%	0.0	86.88%	CP009544.1

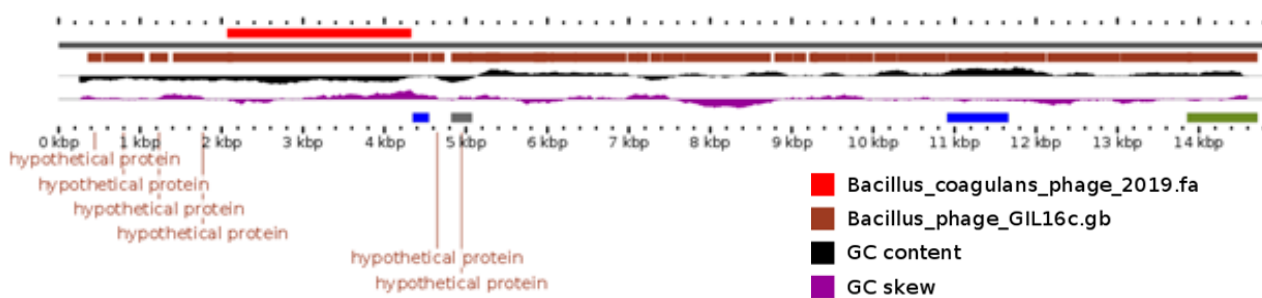


Рис. 4 – Линейная диаграмма гомологии геномов исследуемого бактериофага *Bacillus coagulans* Phagum B.c. 11 УГСХА и *Bacillus* phage GIL16c

но, что семикратное пассирование бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА на бактериальном штамме *Bacillus coagulans* 10268, можно восстановить его литическую активность на 1 порядок. Изменение литической активности фага Phagum B.c. 11 УГСХА в диапазоне от 10^8 до 10^{10} не существенно влияет на свойства фагового биопрепарата, который был сконструирован на основе данного бактериофага [6, 8].

Следующие исследования были направлены на изучение у фага Phagum B.c. 11 УГСХА локусов патогенности и их гомологов.

Нами были получены биоинформационные данные сиквенса *Bacillus coagulans* phage Phagum B.c. 11 УГСХА: длина: 42609 bp, содержание GC: 37,1 %, молекулярный вес: 27 014 203,97 Da, молярность 1 мкг/мл раствора: 0.04 мкм, количество молекул в 1 мкг: 2.23×10^{10} , А 260 из 1 мкг/мл раствора после 100-кратного разведения: 0,259.

При сравнительном анализе полного генома *Bacillus coagulans* phage Phagum B.c. 11 УГСХА были получены результаты, представленные в таблице 1.

В результате сравнительного анализа генома *Bacillus coagulans* phage Phagum B.c. 11 УГСХА с аннотированными в системе NCBI была доказана его уникальность с наибольшим соответствием геному *Bacillus* phage GIL16c (34% идентичности).

В результате проведения сравнительного анализа секвенированного генома *Bacillus coagulans* phage Phagum B.c. 11 УГСХА с эталонным геномом бациллярного бактериофага, представленного в системе NCBI было установлено, что геном *Bacillus* phage GIL16c оказался по гомологии наиболее близким к изучаемому фагу. На рисунках 3 и 4 отражен сравнительный анализ.

Используя генетические данные, был проведен анализ протеома бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА. На рисунке 5 и в таблице 2 отра-

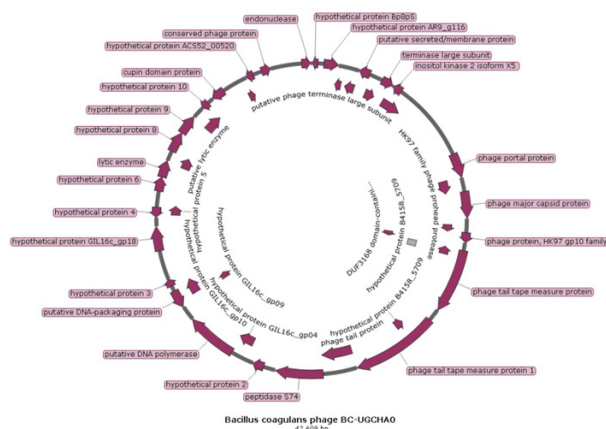


Рис. 5 – Протеомная карта гомологии бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА генетическим маркерам, аннотированным в системе NCBI

жены результаты соответствия протеома и генома (на основе генетического кода аминокислот, характерного для вирусов и бактерий).

Каждый из протеомных компонентов бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА был сопоставлен с аналогами и составлено его филогенетическое картирование для поиска подобия возможных локусов патогенности (рис. 6) и распределение протеомов исследуемого бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА соответственно их молекулярным массам (рис 7).

По полученным данным генетического и протеомного картирования сделали вывод, что бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА не содержит локусов патогенности и их гомологов. Полученные в результате молекулярно-генетических исследований данные позволяют рекомендовать Phagum B.c. 11 УГСХА для изготовления фагового биопрепарата, применяемого не только в лаборатории в целях индикации и идентификации специфичных ему бактерий *Bacillus coagulans*, но и для деконтаминации пищевого сырья и продовольственных товаров, а также профилактики пищевых отравлений [17-18].

Обсуждение

Изученные биологические свойства бак-

Таблица 2

Анализ состава протеома фага Phagum B.c. 11 УГСХА

Feature	Location	Size			Type	
hypothetical protein Bp8p5	36 .. 278	243 bp		←	CDS	hypothetical protein Bp8p5
hypothetical protein AR9_g116	542 .. 1183	642 bp		→	CDS	hypothetical protein AR9_g116
hypothetical protein AR9_g135	1154 .. 1456	303 bp		←	CDS	hypothetical protein AR9_g135
hypothetical protein AR9_g137	1654 .. 2124	471 bp		←	CDS	hypothetical protein AR9_g137
putative secreted/ membrane protein	2117 .. 2617	501 bp		←	CDS	putative secreted/ membrane protein
phage terminase small subunit P27 family	2714 .. 3199	486 bp		→	CDS	phage terminase small subunit P27 fa...
terminase large subunit	3196 .. 3714	519 bp		→	CDS	terminase large subunit
putative phage terminase large subunit	3674 .. 4672	999 bp		→	CDS	putative phage terminase large subunit
inositol kinase 2 isoform X5	3772 .. 4179	408 bp		←	CDS	inositol hexakisphosphate and diphosp..
phage portal protein	7746 .. 8834	1089 bp		→	CDS	phage portal protein
HK97 family phage prohead protease	8788 .. 9417	630 bp		→	CDS	HK97 family phage prohead protease
phage major capsid protein	9456 .. 10 634	1179 bp		→	CDS	phage major capsid protein
phage head closure protein	10 939 .. 11 262	324 bp		→	CDS	phage head closure protein
phage protein, HK97 gp10 family	11 255 .. 11 695	441 bp		→	CDS	phage protein, HK97 gp10 family
DUF3168 domain-containing protein	11 692 .. 12 051	360 bp		→	CDS	DUF3168 domain-containing protein
hypothetical protein B4158_5709	12 015 .. 12 395	381 bp		←	CDS	hypothetical protein B4158_5709
hypothetical protein B4158_5709	12 015 .. 12 395	381 bp		←	misc_feature	
phage tail tape measure protein	12 052 .. 14 889	2838 bp		→	CDS	phage tail tape measure protein
phage tail tape measure protein 1	15 448 .. 19 299	3852 bp		→	CDS	phage tail tape measure protein
hypothetical protein B4158_5709	16 398 .. 16 805	408 bp		←	CDS	hypothetical protein B4158_5709
phage tail protein	19 302 .. 20 804	1503 bp		→	CDS	phage tail protein
peptidase S74	20 801 .. 22 903	2103 bp		→	CDS	peptidase S74
hypothetical protein 2	23 432 .. 23 932	501 bp		→	CDS	hypothetical protein 2
hypothetical protein GIL16c_gp04	24 287 .. 25 024	738 bp		→	CDS	hypothetical protein GIL16c_gp04
putative DNA polymerase	24 954 .. 27 215	2262 bp		→	CDS	putative DNA polymerase
putative DNA-packaging protein	27 878 .. 28 684	807 bp		←	CDS	putative DNA-packaging protein
hypothetical protein GIL16c_gp09	27 925 .. 28 302	378 bp		→	CDS	hypothetical protein GIL16c_gp09
hypothetical protein GIL16c_gp10	28 128 .. 28 874	747 bp		→	CDS	hypothetical protein GIL16c_gp10
hypothetical protein 3	28 925 .. 29 239	315 bp		→	CDS	hypothetical protein 3
hypothetical protein GIL16c_gp18	30 560 .. 31 630	1071 bp		→	CDS	hypothetical protein GIL16c_gp18
hypothetical protein 4	32 020 .. 32 463	444 bp		←	CDS	hypothetical protein 4
hypothetical protein 5	32 138 .. 32 569	432 bp		→	CDS	hypothetical protein 5
hypothetical protein 6	33 176 .. 33 790	615 bp		→	CDS	hypothetical protein 6
lytic enzyme	33 794 .. 34 546	753 bp		→	CDS	lytic enzyme
hypothetical protein 7	34 485 .. 35 006	522 bp		→	CDS	hypothetical protein 7
hypothetical protein 8	35 011 .. 35 913	903 bp		→	CDS	hypothetical protein 8
hypothetical protein 9	35 917 .. 36 798	882 bp		→	CDS	hypothetical protein 9
putative lytic enzyme	36 740 .. 37 606	867 bp		→	CDS	putative lytic enzyme
hypothetical protein 10	37 323 .. 37 670	348 bp		←	CDS	hypothetical protein 10
cupin domain protein	37 934 .. 38 515	582 bp		←	CDS	cupin domain protein
hypothetical protein wp43	39 413 .. 39 718	306 bp		→	CDS	hypothetical protein wp43
hypothetical protein ACS52_00520	39 668 .. 40 003	336 bp		←	CDS	hypothetical protein ACS52_00520
conserved phage protein	40 387 .. 40 794	408 bp		→	CDS	conserved phage protein
endonuclease	42 179 .. 42 562	384 bp		→	CDS	endonuclease

териофага Phagum B.c. 11 УГСХА, выделенного из свежего томата с признаками порчи, специфичного для 46 из 50 бактериальных штаммов *Bacillus coagulans*, позволяют рекомендовать Phagum B.c. 11 УГСХА для изготовления фагового биопрепарата, применяемого не только в лаборатории в целях индикации и идентификации специфичных ему бактерий *Bacillus coagulans*, но и для деконтаминации пищевого сырья и продовольственных товаров, профилактики пище-

вых отравлений, так как данные проведенного нами генетического и протеомного картирования позволяют сделать вывод о том, что бактериофаг Phagum B.c. 11 УГСХА не содержит локусов патогенности и их гомологов. Биоинформационные данные сиквенса *Bacillus coagulans* phage Phagum B.c. 11 УГСХА: длина: 42609 bp, содержание GC: 37,1 %, молекулярный вес: 27 014 203,97 Da, молярность 1 мкг/мкл раствора: 0.04 мкм, количество молекул в 1 мкг: 2.23×10^{10} , А

260 из 1 мкг/мкл раствора после 100-кратного разведения: 0,259.

Экспериментально были подобраны технологические параметры культивирования системы фаг/хозяин (0,2 мл бактериофага к 0,2 мл индикаторной культуры *B. coagulans*), время пассажа - 6 часов при температуре культивирования – $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Для очистки Phagum B.c. 11 УГСХА рекомендовано использовать мембранные фильтры фирмы Millipore 0,22 μm GV.

Определено, что литическая активность по Аппельману составила 10^{-9} , по Грация показатель равен $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ (БОЕ/мл); Phagum B.c. 11 УГСХА обладал строгой специфичностью по отношению к штаммам *B. coagulans*; морфология бляшкообразующих единиц (округлая форма с прозрачным центром, зоны неполного лизиса, диаметр 1-4 мм, вторичного роста не наблюдалось).

✓ conserved phage protein 40 387 .. 40 794 408 bp CDS
/transl_table = 11 (Bacterial, Archaeal and Plant Plastid)
/product = conserved phage protein
/translation = VNNHFLFNWLRDYQKLEEDIAYLEYNLDKTKAELRRWVSGDLREVRLTAESGAKVENRIEAEIYELAHKMND
MYLKLKLSIKFRGLENQLKLKYVDGMTLEEIAEAVNYSSSHIKKHAELVRLIKFVEREVI*
135 amino acids = 16,0 kDa



Рис. 6 – Пример филогенетического картирования бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА

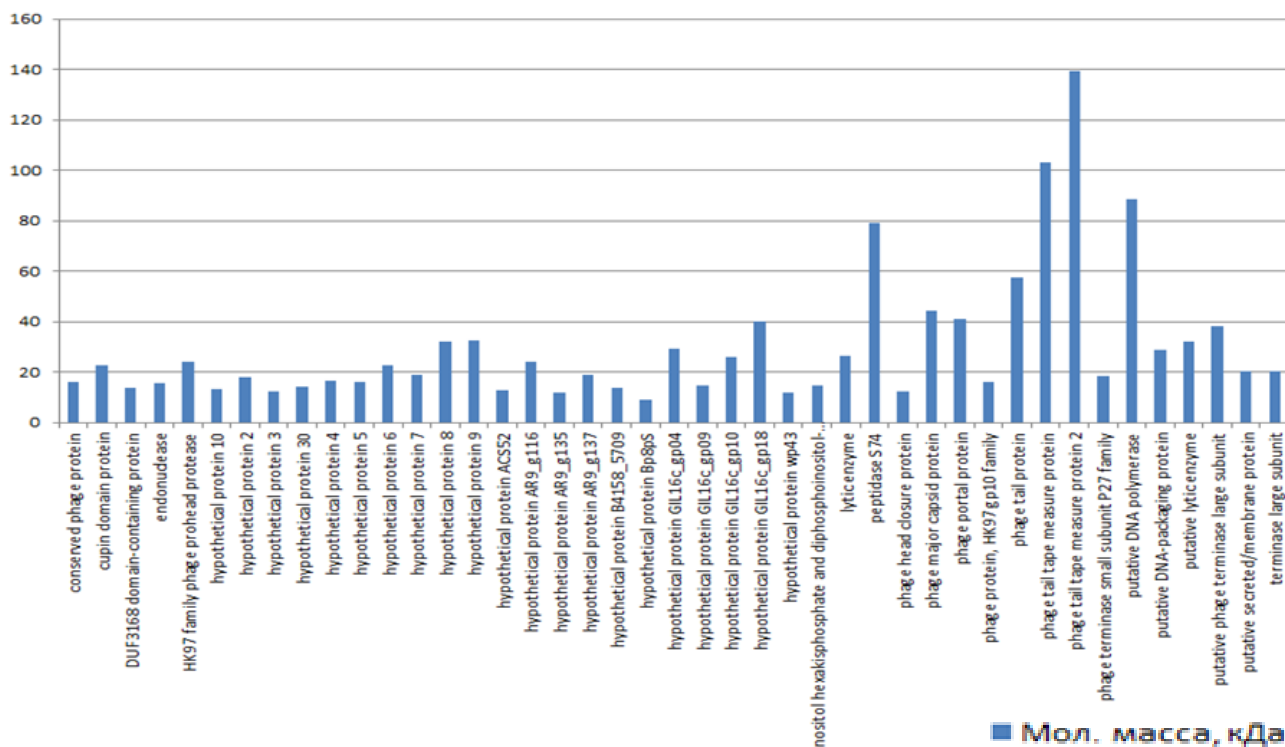


Рис. 7 – Диаграмма распределения протеомов исследуемого бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА соответственно молекулярным массам

Эмпирически установлено, что Phagum В.с. 11 УГСХА не терял литической активности спустя 3 месяца при хранении при температуре 2-4°C, а через 12 месяцев показатель снижался до 10⁸.

Закключение

Биологические свойства Phagum В.с. 11 УГСХА позволяют использовать фаговый препарат, сконструированный на его основе, как для идентификации и видовой дифференциации *Bacillus coagulans*, так и для обработки консервной тары, консервируемого сырья и готовых продуктов питания.

Библиографический список

1. Современная пищевая микробиология / Под ред. Дж. М. Джеймс; пер. с англ. Е. Баранова. – Москва, Бином, 2012. – с. 888.
2. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения / В.Н. Леонтьев, Х.М. Элькаиб, А.Э. Эльхедми // Труды БГУ. – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 125-130.
3. Anderson, R.E. Growth and corresponding elevation of tomato juice pH by *Bacillus coagulans* / R.E. Anderson // J. Food Sci, 1984. – 49: 647, 649.
4. Gustavsson, J. Global food losses and food waste: extent, causes and prevention / J. Gustavsson [et al.]. – Rome : FAO, 2011. – 38 p.
5. Kirkbride, C.A. Porcine abortion caused by *Bacillus* spp. 1986 / C.A Kirkbride, J. Collins // J. Am. Vet. Med. Assoc, 1996. – 188:1060-1061.
6. McKillip, J.L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review / J.L McKillip // Antonie Leeuwenhoek, 2000. – 77:393–399.
7. Production of Diarrheal Enterotoxins and Other Potential Virulence Factors by Veterinary Isolates of *Bacillus* Species Associated with Nongastrointestinal Infections / Neil J. Rowan, George Caldwell, Curtis G. Gemmell, Iain S. Hunter // Applied and environmental microbiology.- 2003. – Vol. 69, No. – p. 2372-2376. – DOI: 10.1128/AEM.69.4.2372–2376.2003.
8. Алешкин, А.В. Биодеконтаминация и продление сроков годности мясных и рыбных полуфабрикатов с помощью бактериофагов / А.В. Алешкин, Э.Р. Зулькарнеев, Ю.В. Ларина // Астраханский медицинский журнал. – 2015. – Т. 10. – № 4. – С. 40-48.
9. Золотухин, С. Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий : 03.00.07 - микробиология, 03.00.23 - биотехнология: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Золотухин Сергей Николаевич, Ульяновская ГСХА. – Ульяновск, 2007. – 32 с.
10. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. – Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. – 510 p.
11. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / W. B. Whitman, P. DeVos, J. Chun, S. Dedysh, B. Hedlund, P. Rainey, M. Trujillo. – Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608> (дата обращения 12.07.2018).
12. Юдина, М.А. Перспективы применения бациллярных бактериофагов / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // «Научно-техническое творчество молодежи – путь к обществу, основанному на знаниях»: материалы III Международной научно-практической конференции. – Москва, 2011. – С. 449 - 451.
13. Бактериофаги рода *Bacillus*: монография / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин – Ульяновск, УГСХА им. П. А. Столыпина, НИИЦМиБ, 2013. – 80 с.
14. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина, А.И. Калдыркаев // Вестник ветеринарии. – 2011.- № 4 (59). – С. 88-89.
15. Wommack, K.E. Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure / K.E. Wommack, R.T. Hill, N.F. Miller, R.R. Colwell // Appl Environ Microbiol. – 1996. – V. 62. – p. 1336-1341.
16. Bacteriophages. Methods and Protocols / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. – Humana Press, Volume 3. – 2018. – 311 p.
17. Knoll, B.M. Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: an overview / B.M. Knoll, E. Mylonakis E. // Clin. Infect. Dis. – 2014. – Т. 58. – № 4. – P. 528-34.
18. Borysowski, J. Phage Therapy: Current Research and Application. J. Borysowski, R. Miedzybrozki, A. Gorski (Eds.). – Warsaw, 2014. – 378 p.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BACTERIOPHAGE PHAGUM B.C. 11 UGSHA

Martynova K. V.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk, Novy Venets boulevard, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: belova_kcena@mail.ru

Key words: *Bacillus coagulans*, *B. bacteriophage Phagum* gr. 11 UGSHA, biological properties, molecular genetic characteristics, biopreparation.

The article presents the results of research on the biological properties of the bacteriophage Phagum B. c. 11 UGSHA. Bioinformatic sequence data of *Bacillus coagulans* phage Phagum B. c. 11 UGSHA: length: 42609 bp, GC content: 37,1 %, molecular weight: 27 014 203,97 Da, the molarity of 1 µg/µl: 0.04 µm, the number of molecules in 1 g: 2.23 x 10¹⁰, And 260 of 1 µg/ml after 100-fold dilution: 0,259. Experimentally technological parameters of cultivation system phage/host were selected (0.2 ml of bacteriophage to 0.2 ml of the indicator culture *B. coagulans*), passage time-6 hours at the cultivation temperature-35±20C. It is recommended to use Millipore membrane filters of 0.22 µm GV for cleaning Phagum B. c. 11 UGSHA. It was determined that the lytic activity by Appelman was 10-9, by Grazia the indicator was 4,0+0,1x10¹⁰ (BFU / ml); Phagum B. c. 11 UGSHA had strict specificity in relation to *B. coagulans* strains; morphology of plaque-forming units (rounded shape with a transparent center, zones of incomplete lysis, diameter 1-4 mm, secondary growth was not observed). It is empirically established that Phagum B. c. 11 UGSHA did not lose its lytic activity after 3 months when stored at a temperature of 2-40C, and after 12 months the indicator decreased to 108. The studied biological properties of bacteriophage Phagum B. c. 11 UGSHA isolated from fresh tomatoes with signs of spoiling, specific for 46 out of 50 bacterial strains of *Bacillus coagulans*, allow us to recommend Phagum B. c. 11 UGSHA for the production of phage biopreparations used not only in the laboratory for the indication and identification of *Bacillus coagulans* bacteria specific to it, but also for decontamination of food raw materials and food products, prevention of food poisoning, since the data of our genetic and proteomic mapping allow us to conclude that the Phagum B. c. 11 UGSHA bacteriophage does not contain pathogenicity locuses and their homologues.

Bibliography

1. Modern food Microbiology /Edited by J. M. James; transl. from Eng. E. Baranova. - M.: Binom, 2012. - p. 888.
2. Food spoilage: types, causes, and ways to prevent it / V.N. Leontyev, Kh.M. Elkaib, A.E. Elkhendi // Works of BSU. - 2013. - V. 8, p. 1. - p. 125-130.
3. Anderson, R.E. Growth and corresponding elevation of tomato juice pH by *Bacillus coagulans* / R.E. Anderson // J. Food Sci. 1984. - 49: 647, 649.
4. Gustavsson, J. Global food losses and food waste: extent, causes and prevention / J. Gustavsson [et al.]. - Rome : FAO, 2011. - p. 38.
5. Kirkbride, C.A. Porcine abortion caused by *Bacillus* spp. 1986 / C.A Kirkbride, J. Collins // J. Am. Vet. Med. Assoc, 1996. - 188:1060-1061.
6. McKillip, J.L. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review / J.L McKillip // Antonie Leeuwenhoek, 2000. - 77:393-399.
7. Production of Diarrheal Enterotoxins and Other Potential Virulence Factors by Veterinary Isolates of *Bacillus* Species Associated with Nongastrointestinal Infections / Neil J. Rowan, George Caldwell, Curtis G. Gemmell, Iain S. Hunter // Applied and environmental microbiology.- 2003. - Vol. 69, No. - p. 2372-2376. - DOI: 10.1128/AEM.69.4.2372-2376.2003.
8. Biodecontamination and extension of expiry dates of meat and fish semi-finished products using bacteriophages / A.V. Aleshkin, E. R. Zulkarneev, Yu. V. Larina // Astrakhan medical journal. - 2015. - V. 10. - № 4. - p. 40-48.
9. Zolotukhin, S. N. Creation and development of schemes for the use of diagnostic biopreparations based on isolated and studied enterobacteria bacteriophages: 03.00.07-microbiology, 03.00.23-biotechnology: abstract of the dissertation for the degree of doctor of biological sciences / Zolotukhin Sergey Nikolaevich, Ulyanovsk SAA. - Ulyanovsk, 2007. - 32 p.
10. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.
11. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / W. B. Whitman, P. DeVos, J. Chun, S. Dedysh, B. Hedlund, P. Rainey, M. Trujillo. - Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015 - URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608> (reference data 12.07.2018).
12. Yudina, M.A. Perspectives of application of bacillar bacteriophages / M. A. Yudina, N. A. Feoktistova, D. A. Vasiliev // «Scientific and technical creativity of youth – the way to a society based on knowledge»: materials of the III International scientific and practical conference. - Moscow, 2011. - P. 449-451.
13. Bacteriophages of genus *Bacillus*: monograph / D. A. Vasiliev, N. A. Feoktistova, S. N. Zolotukhin, A.V. Aleshkin-Ulyanovsk, USAA named after P. A. Stolypin, NRCEM, 2013. - P. 66-67 (80 p).
14. Feoktistova, N.A. Methods of isolation of bacteriophages of the genus *Bacillus* / N. A. Feoktistova, V. A. Makeev, M. A. Yudina, A. I. Kaldyrykaev // Vestnik of veterinary medicine. - 2011. - № 4 (59). - P. 88-89.
15. Wommack, K.E. Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure / K.E. Wommack, R.T. Hill, N.F. Miller, R.R. Colwell // Appl Environ Microbiol. - 1996. - V. 62. - p. 1336-1341.
16. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. - 311 p.
17. Knoll, B.M. Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: an overview / B.M. Knoll, E. Mylonakis E. // Clin. Infect. Dis. - 2014. - V. 58. - № 4. - P. 528-34.
18. Borysowski, J. Phage Therapy: Current Research and Application. J. Borysowski, R. Miedzybrozki, A. Gorski (Eds.). - Warsaw, 2014. - 378 p.