

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГА *BACILLUS CEREUS* FBc – 28 УГСХА

**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»

**Сулдына Екатерина Владимировна**, ассистент 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:** *Bacillus cereus*, бактериофаги, геном, секвенирование, праймеры, продукты.

В статье представлена молекулярно-генетическая характеристика секвенированного бактериофага *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА. Была составлена карта линейной ДНК с расшифровкой кодирующих областей генома. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии его генов. Установлено, что использование фенольно-хлороформной экстракции приводит к наилучшему выходу матричной ДНК. На геноме бактериофага *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА была разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (локусов патогенности) для специфических цереусных бактериофагов – кандидатов для нового высокоэффективного фагового биопрепарата с целью осуществления опосредованного, позволяющего элиминировать (разрушать) патогенные микроорганизмы с пищевого сырья животного происхождения и готовых к употреблению мясных, рыбных, молочных продуктов питания. По результатам экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *HBL enterotoxin* с разработанными системами олигонуклеотидов в геноме бактериофага *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА локусов патогенности выявлено не было.

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

### Введение

По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC Foodborne Outbreak Online Database) в США ежегодно регистрируется более 60 000 случаев заболеваний, вызванных бактериями *B. cereus*. При этом отмечается, что некоторым пациентам с рвотной симптоматикой при бациллярной пищевой инфекции ошибочно диагностируют интоксикационный синдром, вызванный *Staphylococcus aureus*, в то время как ложным возбудителем диарейного типа этой токсикоинфекции считают *Clostridium perfringens* [1-3]. В связи с этим контроль *B. cereus* в ряде продуктов является обязательным санитарно-эпидемиологическим показателем, утвержденным в СанПиН 2.3.2.1078-01 [4].

Известно, что диарейный синдром, как правило, связан с *Bacillus cereus* HBL комплексом диарейного энтеротоксина, существует по крайней мере 14 других видов из родов *Bacillus* и *Raenibacillus*, к ним относятся *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus* и др., которые, как установлено, вызывают пищевое заболевание [5-6].

Процесс осуществления опосредованного биопроектирования (обработки бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции, способствующей

увеличению сроков хранения), позволяющего элиминировать (разрушать) патогенные микроорганизмы с пищевого сырья животного происхождения и готовых к употреблению мясных, рыбных, молочных продуктов питания не может исключать применение биопрепаратов на основе специфических бактериофагов [7]. Благодаря особенностям своей биологии бактериофаги могут являться мощными агентами горизонтального переноса генов от бактерии к бактерии. Бактериофаги, предназначенные для обработки продуктов питания, должны быть исследованы методами геномики для определения их потенциальной способности к переносу генов бактерий [8-9].

Цель исследований – проведение молекулярно-генетических исследований бактериофага *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА для подтверждения оригинальности, вирулентной природы и отсутствия локусов патогенности с целью выявления бактериофага - кандидата для осуществления опосредованного биопроектирования, позволяющего элиминировать (разрушать) патогенные микроорганизмы с пищевого сырья животного происхождения и готовых к употреблению мясных, рыбных, молочных продуктов питания.

**Объекты и методы исследований**

Бактериофаг *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА выделен из пробы почвы, характеризовался показателями литической активности  $9,0 \pm 1,0 \times 10^{11}$  БОЕ/мл по Грациа и  $10^{-10}$  по Аппельману, лизировал 100 % из 13 штаммов *Bacillus cereus*, выделенных нами из объектов ветеринарно-санитарного надзора (включая пищевое сырье животного происхождения и готовые мясные, рыбные, молочные продукты) и идентифицированных с применением нескольких схем [10-13].

Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома бактериофага использовали полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов второго поколения (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Бактериофаг *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА был секвенирован трижды. Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геном бактериофага с высокой достоверностью.

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

Спектрофотометрическое измерение оптической плотности пробы при 260 нм, 280 нм и 230 нм проводили с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000/2000c (ThermoFisher).

Для оптимизации ПЦР-протокола, в реакциях со штаммами *Bacillus cereus*, был использован электрофоретический метод детекции продуктов амплификации.

### Результаты исследований

Первым этапом исследований производственно-перспективного штамма бактериофага *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА было проведение ряда исследований, направленных на определение его молекулярно-генетической характеристики, включающей определение размера фагового генома, процента его идентичности с таксономически наиболее близкими бактериофагами, проверку отсутствия в составе ДНК генов, кодирующих токсины, интегразы, репрессоры транскрипции и другие нежелательные локусы. Изучение данных характеристик позволит нам подтвердить оригинальность и вирулентную природу бактериофага.

При секвенировании был получен массив данных, представленный ниже, для исследуемого бактериофага.

Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геномы бактериофагов с высокой достоверностью. На рисунке 1 собранный геном сравнивали с известными ДНК бактериофагов, депонированных в GenBank NCBI для определения

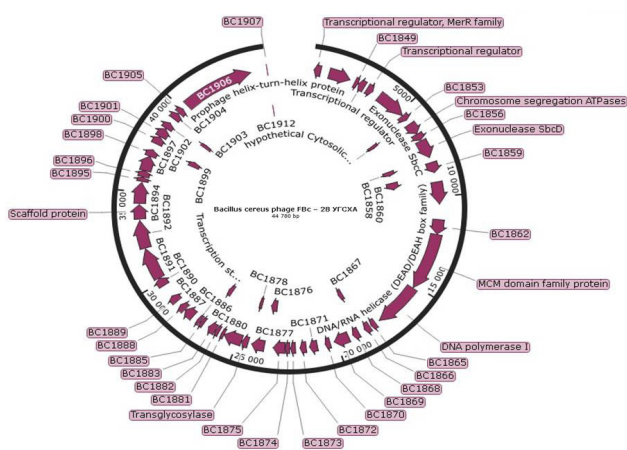


Рис. 1 - Карта линейной ДНК бактериофага *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА с расшифровкой кодирующих областей генома

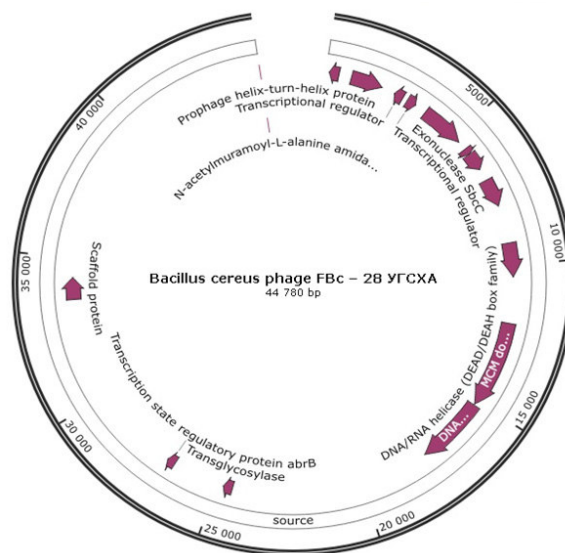


Рис. 2 - Карта линейной ДНК бактериофага *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА. Картирование генов, для которых определены гомологии

кодирующих областей геномов.

В результате проведенных исследований были составлены карты линейных ДНК выделенного и селекционированного бактериофага *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии его генов. Качественный состав протеинов бактериофага соответствует таковым у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов,

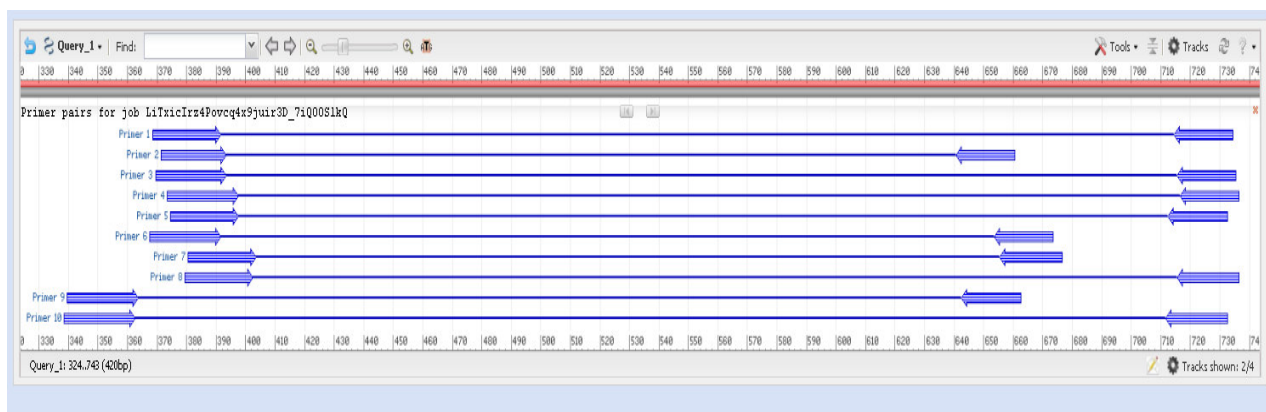


Рис. 3 - Результаты подбора праймеров к участку гена *HBL enterotoxin*

Primer pair 1									
Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Reverse primer	GAGATGCAAAAATTAATGCGGGC	Plus	23	369	391	60.06	43.48	6.00	3.00
Product length	TCCGATTCCTAGCGGAGTTC	Minus	20	734	715	59.90	55.00	4.00	2.00
Primer pair 2									
Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Reverse primer	ATGCAAAAATTAATGCGGGC	Plus	22	372	393	58.22	36.36	6.00	3.00
Product length	CTGTGCGCAACACAGATGAACCG	Minus	20	660	641	59.56	55.00	8.00	2.00
Primer pair 3									
Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Reverse primer	AGATGCAAAAATTAATGCGGGC	Plus	24	370	393	60.44	37.50	6.00	3.00
Product length	ATGCGATTCCTAGCGGAGTT	Minus	20	735	716	59.25	50.00	4.00	0.00
Primer pair 4									
Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Reverse primer	GCAAAAATTAATGCGGGC	Plus	24	374	397	60.55	41.67	7.00	3.00
Product length	AATGCGATTCCTAGCGGAGT	Minus	20	736	717	59.25	50.00	4.00	2.00
Primer pair 5									
Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Reverse primer	CWAATTAATGCGGGC	Plus	23	375	397	57.94	38.13	7.00	3.00
Product length	CAGATTCCTAGCGGAGTTCCT	Minus	20	732	713	59.97	55.00	4.00	2.00
Primer pair 6									
Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Reverse primer	AGAGATGCAAAAATTAATGCGGGC	Plus	24	368	391	61.26	41.67	6.00	3.00
Product length	ATTGGCCCTAAAGCTGTCGC	Minus	20	673	654	61.03	55.00	6.00	2.00
Primer pair 7									
Forward primer	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Reverse primer	TTAATGCGGGC	Plus	23	381	403	57.50	34.78	7.00	2.00
Product length	CAATTTGGCCCTAAAGCTGTC	Minus	21	676	656	60.13	52.38	6.00	2.00

Рис. 4 - Результаты подбора праймеров к участку гена *HBL enterotoxin*

активных в отношении изучаемых видов бактерий.

Одним из основных критериев биологических свойств бактериофагов является наличие в структуре их генома островков патогенности. С позиции горизонтального переноса генов патогенности у бактерий семейства *Bacillus* важным вирулентным фактором является энтеротоксин, входящий в HBL-комплекс. Структура токсина закодирована в гене *HBL enterotoxin*.

В рамках данной работы были проведены исследования по изучению структуры данного токсина, его наиболее консервативных участков, которые будут использованы для разработки системы детекции данного гена в геномах бактериофагов, специфичных для представителей группы «*Bacillus cereus*», выделенных нами ранее.

На первом этапе был проведен анализ нуклеотидного состава и выравнивание гена энтеротоксина для выявления консервативных участков.

На основании консервативных участков гена были подобраны праймеры для детекции данного гена методом ПЦР при скрининге бактериофагов. Его отсутствие будет свидетельствовать о перспективности применения данных бактериофагов при обработке пищевого сырья. Данные подбора пред-

ставлены на рисунке 3-4.

Одним из важных этапов в практике проведения молекулярно-генетических экспериментов является экстракция нуклеиновых кислот. Для этого было использовано несколько различных технологий очистки нуклеиновых кислот от ферментов, белков, ионов, которые могут существенно усложнить прохождение реакции, а в некоторых случаях и вовсе ингибировать действие ДНК-полимеразы [14-15].

После этапа экстрагирования нуклеиновых кислот было проведено спектрофотометрическое измерение оптической плотности каждой пробы при 260 нм, 280 нм и 230 нм с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000/2000c (ThermoFisher). При этом были использованы расчеты  $A_{260}/A_{230}$ , позволяющие вычесть примеси, не относящиеся к поглощению светового потока нуклеиновыми кислотами. Для определения чистоты ДНК использовались расчеты  $A_{260}/A_{280}$ , при этом образцы считались с содержанием достаточно чистой для использования в ПЦР ДНК при коэффициенте не менее 1,8. Результаты представлены в таблицах 1-2. Примеры графиков спектра поглощения – на рисунках 5-6.

Таблица 1

**Расчет коэффициента чистоты ДНК с использованием сорбентной методики с применением гуанидинтиоционата**

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
бактериофаг FBc – 28 УГСХА - <i>Bacillus cereus</i>	242,7	ng/ $\mu$ l	4,854	0,511	1,91	0,85

После ряда проведенных исследований и расчетов коэффициента чистоты экстрагированных нуклеиновых кислот было сделано заключение, что использование фенольно-хлороформной экстракции приводит к наилучшему выходу матричной ДНК, что и было использовано в дальнейших исследованиях.

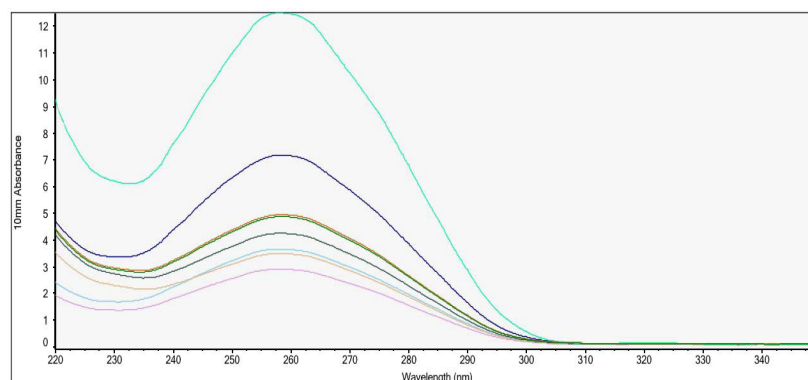
Была определена пара праймеров, отвечающая оптимальным нашим условиям: GC не более 60 %, температура плавления  $\approx$  60 °С, длина ампликона от 200 до 400 п.н., длина праймеров от 18 до 24 п.н. (табл. 3).

После подбора праймерных систем к участку гена *HVL enterotoxin* одной из первоочередных задач являлось определение их работоспособности на пробах, содержащих экстрагированную ДНК вышеуказанных культур. Для этого необходимо было провести цикл экспериментов с применением метода полимеразной цепной реакции с последующей детекцией методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Проверка работоспособности и специфичности праймеров для участков генов GAGATGCAAAAATTAATGCGGCG и TGCGATTCTAGCGGAGTTC, а также оптимизация режима проведения ПЦР (температурный режим, количество циклов, концентрация праймеров для реакции) были проведены на музейных и полевых штаммах *Bacillus cereus*, а также на клинических образцах.

Температура отжига праймеров при проведении экспериментов подбиралась эмпирическим путем, исходя из их расчетных температур плавления. Однако необходимо было подобрать такую температуру, чтобы отжиги праймеров для участков генов GAGATGCAAAAATTAATGCGGCG и TGCGATTCTAGCGGAGTTC были близки. Это нужно для создания универсального протокола проведения полимеразной цепной реакции при обнаружении ДНК *Bacillus cereus*, так как это экономит не только время исследования,

но и сбережет ресурс работы амплификатора, что особенно актуально при проведении массовых анализов.

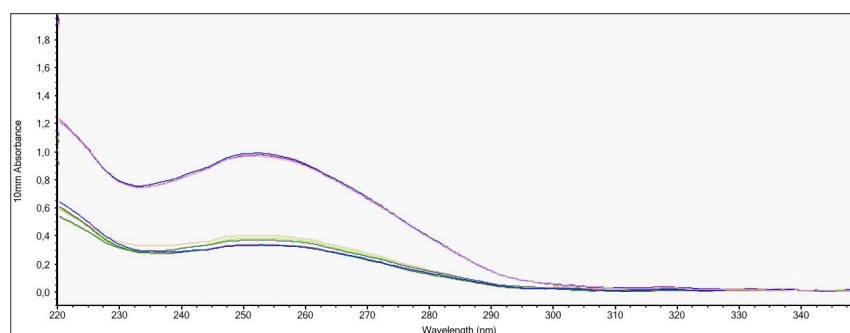


**Рис. 5 - Графики спектра поглощения препаратов ДНК бактериофагов, полученных с использованием сорбентной методики с применением гуанидинтиоционата**

Таблица 2

**Расчет коэффициента чистоты ДНК с использованием методики фенольно-хлороформной экстракции**

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
бактериофаг FBc – 28 УГСХА - <i>Bacillus cereus</i>	48,7	ng/ $\mu$ l	0,973	2,594	1,87	1,69



**Рис. 6 - Графики спектра поглощения препаратов ДНК бактериофагов, полученных с использованием методики фенольно-хлороформной экстракции**

Диапазон температур, с которым пришлось работать, был достаточно велик: от 50 °С до 75 °С. В результате исследований первой части данного этапа проекта было установлено, что температура отжига 60 °С может быть использована для систем праймеров для идентификации гена *HBL enterotoxin*. Однако для систем праймеров для идентификации гена регулятора *HBL enterotoxin* на матрице ДНК бактерий группы «*Bacillus cereus*»: *Bacillus cereus* требуется оптимизация программы амплификации и температуры отжига, т. к. на электрофореграмме присутствуют неспецифические полосы ампликонов, имеющих различную длину.

После ряда проведенных исследований с различными температурами отжига было установлено, что температура 60 °С для всех систем праймеров позволяет получить ампликоны, являющиеся специфичными для всех исследуемых мишеней. Также в процессе исследований была определена оптимальная программа амплификации, позволяющая добиться высокой специфичности для систем праймеров для идентификации гена регулятора *HBL enterotoxin* на матрице ДНК бактерий *Bacillus cereus* (табл. 4).

Также опытным путем была подобрана концентрация праймеров на реакцию. Слишком малое количество праймеров могло привести к появлению ампликонов большой длины (более 1000–2000 п.о.). Это связано с тем, что праймеры на каж-

дом цикле, отжигаясь на матрице, в дальнейшем в реакции не участвуют, так как они являются основой для работы Таq–ДНК–полимеразы и входят в структуру ампликонов. Иначе говоря, при нехватке ограничивающих праймеров и исходном достаточном количестве матрицы ДНК *Bacillus cereus* Таq–ДНК–полимераза работает без ограничения участка, то есть столько, сколько ей позволяет ее активность. А при слишком большой концентрации праймеры образуют димеры, отжигаясь на самих себя или на пару, образуя ампликоны длиной не более 100 п.о. Однако следует заметить, что димеры обычно начинают образовываться на конечных циклах реакции. Таким образом, были подобраны оптимальные с точки зрения эффективности ПЦР концентрации праймеров для каждой реакции. Однако и в этом случае оказалась необходимой универсальность их рабочих количеств. После ряда проведенных экспериментов была определена оптимальная универсальная концентрация каждого из праймеров – 10 рmol на реакцию объемом 25 мкл.

При оптимизации ПЦР-протокола был использован электрофоретический метод детекции продуктов амплификации. На рисунке 8 представлен окончательный результат этих экспериментов.

В результате была разработана ПЦР-система для индикации наличия фрагмента гена *HBL enterotoxin*. При её применении фрагментов вирулентного гена энтеротоксина бактерий *Bacillus* в геноме бактериофага *Bacillus cereus* FВс – 28 УГСХА обнаружено не было, что свидетельствует о возможном его применении для деконтаминации пищевых продуктов.

#### Выводы

В результате проведенных исследований были получены сиквенсовые данные генома бактериофага *Bacillus cereus* FВс – 28 УГСХА, была составлена карта линейной ДНК с расшифровкой кодирующих областей генома. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии их генов. Качественный состав протеинов бактериофага *Bacillus cereus* FВс – 28 УГСХА соответствует таковым у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая дан-

Таблица 3

#### Характеристика праймеров к участку гена *HBL enterotoxin*

Параметр	Характеристика
<b>участок гена <i>HBL enterotoxin</i></b>	
Праймер 1 (f) 5'-3'	GAGATG-CAAAAATTAAT-GCGGCG
Праймер 2 (r) 5'-3'	TGCGATTCTAGC-GGAGTTC
Расчетная температура плавления прямого праймера	60,0 °С
Расчетная температура плавления обратного праймера	59,9 °С
Размер ампликона, п.н.	366

Таблица 4

#### Программа для амплификации ДНК

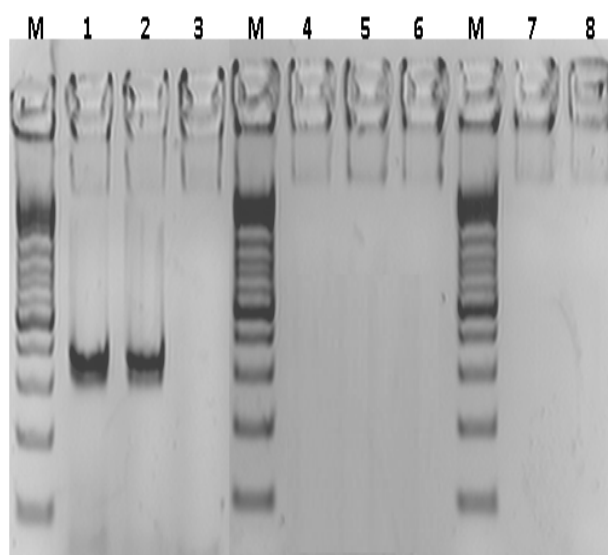
Для амплификаторов с активным регулированием (по раствору в пробирке): «Терцик» (НПО «ДНК–Технология», Россия)				
№ цикла	Шаг	Температура	Длительность	Количество повторов
1	1	95 °С	1 мин	1
2	1	95 °С	10 сек	30
	2	60 °С	10 сек	
	3	72 °С	20 сек	
3	1	72 °С	2 мин	1

ным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемых видов бактерий. Установлено, что использование фенольно-хлороформной экстракции приводит к наилучшему выходу матричной ДНК. Разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) в геномах бактериофагов, активных в отношении *Bacillus cereus* и предполагаемых для применения в качестве специального средства для деконтаминации пищевого сырья и готовых к употреблению мясных, рыбных и молочных продуктов питания. Определена уникальность гена-кандидата, и выбран фрагмент, кодирующий ген HBL enterotoxin. Характеристика праймеров к участкам гена HBL enterotoxin генома фагов, активных в отношении *Bacillus cereus*: прямой праймер (f) 5'-3' – GAGATGCAAAAATTAATGCGGCG; обратный праймер (r) 5'-3' – TGCGATTCCSTAGCGGAGTTC; расчетная температура плавления прямого праймера - 60,0 °С; расчетная температура плавления обратного праймера - 59,9 °С; теоретическая специфичность - *Bacillus cereus*; длина амплифицируемого участка (п.о.) – 366. По результатам экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена HBL enterotoxin культур *Bacillus cereus* с разработанными системами олигонуклеотидов в геноме бактериофага *Bacillus cereus* FBc – 28 УГСХА локусов патогенности выявлено не было.

Полученные данные позволяют рекомендовать бактериофаг *Bacillus cereus* FBc – 28 УГСХА для конструирования нового высокоэффективного фагового биопрепарата с целью осуществления опосредованного биопроцессинга (обработки бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции, способствующей увеличению сроков хранения), позволяющего элиминировать (разрушать) патогенные микроорганизмы с пищевого сырья животного происхождения и готовых к употреблению мясных, рыбных, молочных продуктов питания.

#### Библиографический список

1. Scallan, E. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens / E. Scallan, R.M. Hoekstra, F.J. Angulo // *Emerg Infect Dis.* – 2011. – №17(7) – P. 15.
2. Phelps, L.S. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillus* outside the *Bacillus cereus* group / L.S. Phelps, J.L. McKillip // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – vol. 68. – P. 3147-3151.
3. Pruss, V.M. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group / V.M. Pruss, R. Dictrich, V. Nibler, E. Martibauer, S. Scherer // *Appl. Environ. Microbiol.* –



**Рис. 7 - Результаты амплификации фрагмента гена HBL enterotoxin.**

*M* – маркер молекулярного веса; 1, 2 – положительный контроль; 3 – бактериофаг FBc – 28 УГСХА - *Bacillus cereus*; 4 – отрицательный контроль

1999. – vol. 65. – P. 5436-5442.

4. Распространение генов комплекса immune evasion cluster и других факторов вирулентности у *Staphylococcus aureus* / В.В. Гостев, А.Е. Гончаров, М.А. Грачева, С.В. Сидоренко // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2013. – Т.15. - № 4. – С.270-278.

5. Техэксперт. СанПиН 2.3.2.1078-01 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901806306> - дата обращения 12.02.2018.

6. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.

7. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. – 311 p.

8. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации / А.В. Алешкин, Э.А.Светоч, Н.В.Воложанцев, И.А.Киселева, Е.О.Рубальский, О.Н.Ершова, Л.И.Новикова // *Бактериология.* – 2016. – Том. 1. - № 1. – С. 22-32.

9. Зилькарнеев Эльдар Ринатович. Разработка средства деконтаминации и продления срока годности охлажденной рыбы на основе бактериофагов: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06 / Э.Р. Зилькарнеев. – Астрахань, 2017. – С 24 с.

10. Белова, К.В. Бактериофаги *Bacillus coagulans*: способ выделения и параметры культивирования / К.В. Белова, Н.А. Феоктистова, Д.А.

Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2016. - № 2 (34). - С. 80-86.

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

12. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus*-Nonmedical / R.A. Slepecky, H.T. Hemphill // *Prokaryotes*. - 2006. - № 4. - P. 530-562.

13. Феоктистова, Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вы-

зывающих порчу продуктов питания (БВП) / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин С.Н. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1 (29). - С. 69-76.

14. Аукенов, Н.Е. Выделение и очистка нулеиновых кислот. состояние проблемы на современном этапе / Н.Е. Аукенов, М.Р. Масабаяева, У.У. Хасанова // *Наука и здравоохранение*. - 2014. - № 1. - С.51-53.

15. Кулмаганбетова, Г.Н. Современные проблемы биологии / Г.Н. Кулмаганбетова. - Астана, 2012. -12 с.

## MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF BACILLUS CEREUS FBC-28 UGSKHA BACILLIOPHAGE

**Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Mastilenko A.V., Suldina E.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, bacteriophages, genome, sequencing, primers, products.*

The molecular genetic characteristic of the sequenced bacteriophage *Bacillus cereus* phage FBC-28 UGSKhA is presented in the article. A map of linear DNA was compiled with the decoding of the coding genome areas. In accordance with the known analogs, products of expression of its genes were determined. It was found that the use of phenol-chloroform extraction leads to the best yield of matrix DNA. A system of molecular genetic indication (using PCR) of autonomous genetic elements (pathogenicity loci) for specific cerebous bacteriophage candidates for a new highly effective phage biopreparation was developed on the basis of genome of the bacteriophage *Bacillus cereus* phage FBC-28 UGSKhA. Its purpose is indirect, allowing to eliminate (destroy) pathogenic microorganisms from food raw materials of animal origin and ready-to-eat meat, fish, dairy products. According to the results of experimental studies, the indication of a specific fragment of the HBL enterotoxin gene with the developed systems of oligonucleotides in the genome of bacteriophage *Bacillus cereus* phage FBC-28 of UGSKhA did not reveal pathogenic loci.

### *Bibliography*

1. Scallan, E. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens / E. Scallan, R.M. Hoekstra, F.J. Angulo // *Emerg Infect Dis*. - 2011. - № 17(7) - P. 15.

2. Phelps, L.S. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillus cereus* group / L.S. Phelps, J.L. McKillip // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2002. - vol. 68. - P. 3147 - 3151.

3. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group / B.M. Pruss, R. Dictrich, B. Nibler, E. Martibauer, S. Scherer // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1999. - vol. 65. - P. 5436 - 5442.

4. Expansion of the immune evasion cluster and other virulence factors of *Staphylococcus aureus* / V.V. Gostev, A.E. Goncharov, M.A. Gracheva, S.V. Sidorenko // *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. - 2013. - Volume 15, № 4. - P. 270 - 278.

5. Sanitary Rules and Regulations 2.3.2.1078-01. Techexpert. Hygienic requirements for food safety and nutritional value - URL: <http://docs.cntd.ru/document/901806306> - access date 12.02.2018.

6. Kutter, E. *Bacteriophages: biology and applications* / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. - 510 p.

7. *Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3* / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. - 311 p.

8. Innovative directions of using bacteriophages in the sanitary and epidemiological welfare of the population of the Russian Federation / A.V. Aleshkin, E.A. Svetoch, N.V. Volozhanantsev, I.A. Kiseleva, E.O. Rubalsky, O.N. Ershova, L.I. Novikova // *Bacteriology*. - 2016. - Volume. 1, № 1. - P. 22-32.

9. Zulkarneev, Eldar Rinatovich. Development of means for decontamination and prolongation of expiry date based on bacteriophages of chilled fish: author's abstract of dissertation of Candidate of Biological Sciences: 03.02.03; 03.01.06 / E.R. Zulkarneev. - Astrakhan, 2017. - 14 p. (24p).

10. Belova, K.V. Bacteriophages *Bacillus coagulans*: a method of isolation and cultivation parameters / K.V. Belova, N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2016. - № 2 (34). - P. 80 - 86.

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

12. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus*-Nonmedical / R.A. Slepecky, H.T. Hemphill // *Prokaryotes*. - 2006. - № 4. - P. 530 - 562.

13. Феоктистова, Н.А. Results of a comparative analysis of bacteriological methods of studying cocoa powder for the presence of bacilli that cause food spoilage / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2015. - № 1 (29). - P. 69 - 76.

14. Aukenov, N.E. Isolation and purification of nucleic acids, the state of the problem at the present stage / N.E. Aukenov, M.R. Masabaeva, U.U. Khasanova // *Science and public health*. - 2014. - № 1. - P.51-53.

15. Kulmaganbetova, G.N. *Modern problems of biology* / G.N. Kulmaganbetova. - Astana, 2012. - 12 p.