

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ РОСТА ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Сулдына Екатерина Владимировна¹, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Ларионова Ольга Сергеевна², доктор биологических наук, заведующая кафедрой «Микробиология и биотехнология»

¹ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017. г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1, тел.: 89374545651

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

²ФГБОУ ВО Вавиловский университет

410012. г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина зд. 4, стр. 3.

e-mail: larioнова1@mail.ru

Ключевые слова: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, листериин, листериоз, зооноз, инфекция, пищевые патогены, бактериофаг, бактерия.

Листериоз – это инфекционное заболевание, вызываемое *Listeria monocytogenes*, которое характеризуется высоким процентом смертности. Возбудителя этого зооноза, часто выделяют из продуктов животного и растительного происхождения, что указывает на прямую связь между листериозом человека и циркуляцией *L. monocytogenes* у сельскохозяйственных животных и в окружающей среде. Бактериофаги литической природы были признаны полезным средством биоконтроля патогенов (в т.ч. *L. monocytogenes*) в пищевой промышленности. В связи с этим цель проведенных исследований заключалась в выделении, селекции и оптимизации условий роста специфических вирулентных бактериофагов активных в отношении *L. monocytogenes*. Всего из 16 образцов сточных вод было выделено 3 чистых линии фагов литической природы: F-11, F-12 и B-13.

Оптимизированы наиболее важные факторы, влияющие на рост бактериофагов. Результаты экспериментов показали, что оптимальная температура инкубации и время роста выделенных бактериофагов составляет 24°C и 30 часов при MOI 0,1 и pH = 7. Титр фаголизатов составил от $1,4 \pm 0,1 \times 10^8$ до $2,1 \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ/мл (по Грациа) и от 10^7 до 10^9 (по Аппельману). Изучение специфичности и диапазона литического действия показало, что выделенные бактериофаги лизируют бактерии вида *Listeria monocytogenes* в пределах 71,4%-92,8% и не способны аннигилировать культуры гетерологичных родов и видов бактерий.

Проведенные исследования свидетельствуют о возможности дальнейшего использования изучаемых бактериофагов в качестве средства обработки готовой к употреблению продукции животного и растительного происхождения с целью увеличения сроков ее хранения и профилактики пищевых отравлений.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2023 году.

Листериоз, также называемый «силосной болезнью», вызывается бактерией *Listeria monocytogenes*. Это инфекционное заболевание животных и человека, протекающее преимущественно в виде сепсиса и энцефалита [1-4]. Во всем мире листериоз встречается в спорадической или эпидемической форме [4]. Листерии поражают большое количество представителей животного мира, включая сельскохозяйственных (овец, коз, крупный рогатый скот, буйволов, лошадей, свиней, верблюдов), домашних (собак), диких животных, птиц, а также людей. В основном поражаются мелкие рогатые животные, особенно овцы [5]. И несмотря на то, что инфицированные животные и загрязненная сельскохозяйственная среда редко напрямую вызывают инфекцию у людей, пищевые продукты животного происхождения, которые не обрабатываются перед употреблением и сырые продукты

растительного происхождения, загрязненные навозом инфицированных животных, представляют прямую связь между листериозом человека и циркуляцией *L. monocytogenes* у сельскохозяйственных животных и в окружающей среде. В многочисленных исследованиях бактерии *L. monocytogenes* были выделены из мяса и/или молока коз, овец, крупного рогатого скота, свиней, кур, перепелов, куропаток, страусов и буйволов [6-7] морепродуктов [8-9], овощей и фруктов [10-13] и других готовых к употреблению продуктов [14].

В настоящее время, когда существуют опасения по поводу повышенной устойчивости бактериальных патогенов к антибиотикам, наряду с проблемами, связанными с безопасностью пищевых продуктов, использование бактериофагов представляет большой интерес. Бактериофаги литической природы были признаны полез-

ным средством биоконтроля *L. monocytogenes* в пищевой промышленности [15-17].

В связи с этим целью этой работы стало выделение, селекция и оптимизация условий роста специфических вирулентных бактериофагов, активных в отношении *L. monocytogenes*.

Материалы и методы исследований

Исследования проведены на базе кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ и Мелекесского центра ветеринарии и безопасности продовольствия им. С.Г. Дырченкова.

Штаммы микроорганизмов

В работе использовали референсные штаммы бактерий вида *Listeria monocytogenes* (56, 9-127, 9-72), полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ в качестве индикаторных культур.

В исследованиях по изучению диапазона литического действия выделенных бактериофагов дополнительно использовали 11 штаммов *L. monocytogenes*, 3 - *L. ivanovii*, 2 - *L. innocua*, 2 - *L. seeligeri*, 1 - *L. grayi*, 1 - *L. murrayi*, 1 - *L. welshimeri*, 1 - *Erysipelothrix insidiosa*, 1 - *Jonesia dentrificans*, 4 - *Staphylococcus aureus*, 1 - *Rhodococcus equi*. Бактерии обладали типичными для данных родов и видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

Питательные среды и реактивы

Мясопептонный агар (Nutrient Agar, TM Media, Rajasthan, India) 0,7 %-ный, 1,5%-ный; мясопептонный бульон (Nutrient Broth, TM Media, Rajasthan, India); агар - агар (Agar Agar, TM Media, Rajasthan, India), TSB (триптоно-соевый) агар (Tryptic Soy Agar, India), TSB (триптоно-со-

евый) бульон (Tryptic Soy Broth, India), набор для окраски по Граму, CaCl₂*2H₂O (Calcium chloride dihydrate, for analysis, meets the specification of Ph. Eur., 250GR, «KIMYO.UZ»).

Оборудование

Для проведения работ использовали стандартный набор лабораторного оборудования и посуды.

Сбор и обработка проб сточных вод

Шестнадцать образцов сточных вод были отобраны из очистных сооружений и канализационных стоков города Ульяновска и Ульяновской области. Из соображений безопасности пробы отбирались стерильными шприцами. Образцы были доставлены в лабораторию и хранились в соответствующих температурных условиях. Выделение бактериофагов проводили без обогащения, для этого готовили субстрат в соотношении 1:10, для этого в колбу емкостью 100 мл вносили 45,0 мл мясопептонного бульона и 5,0 мл исследуемого материала. Для лучшего связывания бактериофага с бактерией-хозяином к каждому образцу сточных вод добавляли 1%-ный раствор хлорида кальция. Образцы инкубировали в течение 48 часов при 28°C. По истечении времени фильтровали субстрат через бумажные фильтры и центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин. Получившийся супернатант пропускали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм и исследовали на наличие бактериофагов в комбинации с индикаторными культурами.

Выделение бактериофагов

Для выделения специфических бактериофагов использовали метод агаровых слоев по Грациа с некоторыми модификациями. Для первого слоя готовили 1,5 % триптико-соевый агар, с добавлением 0,1% CaCl₂ и подсушивали

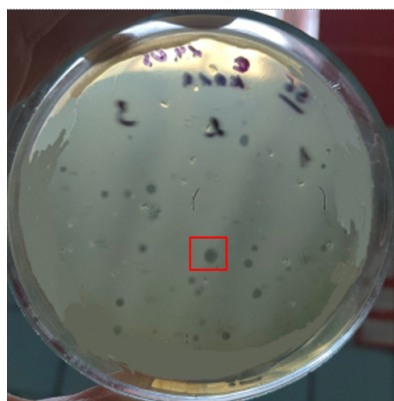


Рис. 1 – Отбор негативной колонии для получения чистой линии фага F-11

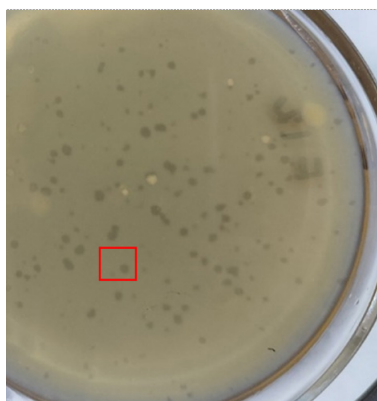


Рис. 2 - Отбор негативной колонии для получения чистой линии фага F-12

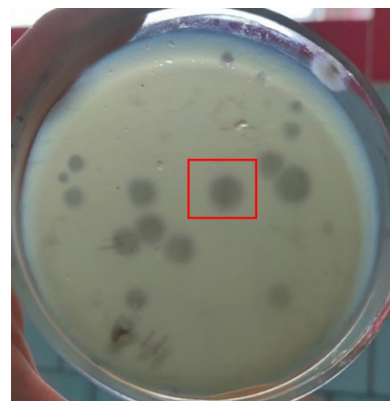


Рис. 3 - Отбор негативной колонии для получения чистой линии фага F-12

в условиях термостата при температуре 30°C. Для формирования второго слоя использовали расплавленный 0,7% триптико-соевый агар с добавлением 0,1% CaCl₂, куда вносили исследуемый фильтрат и 18 часовую индикаторную культуру в соотношении 1:2. Посевы инкубировали при 28°C в течение 24-36 часов. Положительным результатом считали наличие на среде негативных колоний, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста индикаторной культуры, отрицательным – газонный рост бактериальной культуры.

Селекцию фагов проводили с помощью анализа бляшек. Фильтрат серийно разводили в фосфатном буфере (рН=7,6), смешивали с индикаторной культурой и инкубировали при 28°C в течение 24 часов. После инкубации одну изолированную негативную колонию (прозрачную, без зоны неполного лизиса, максимального размера) отбирали и элюировали в фосфатном буфере при 22°C в течение 24 часов. Процедуру повторяли 5-7 раз до получения чистых линий фагов. В этом исследовании были получены три изолята фагов, получившие названия F-11, F-12 и B-13.

Оптимизация условий выращивания бактериофагов

Для подбора оптимального значения рН устанавливали титр фагов, как упоминалось ранее, после инкубации системы фаг-бактерия на питательных средах с различными значениями рН 5, 6, 7, 8 и 9.

Для оптимизации температуры культивирования фагов с индикаторной культурой чашки инкубировали при температурах: 18, 24, 30, 36 °C. Затем оценивали титр фагов в серийных разведениях.

Чтобы оптимизировать время инкубации, чашки засеянные методом агаровых слоев, термостатировали при 28 °C в течение 12, 24, 30 и 36 часов. Оценку литической активности проводили по вышеописанному методу.

Результаты исследований

Из 16 отобранных проб сточных вод 3 образца дали положительный результат на наличие фага. На рисунках 1-3 показан отбор изолированных негативных колоний для селекции и формирования чистых фаговых линий.

Титр селектированных фагов доводили до 8-10 ln (БОЕ/мл) при стандартных условиях (1:2,

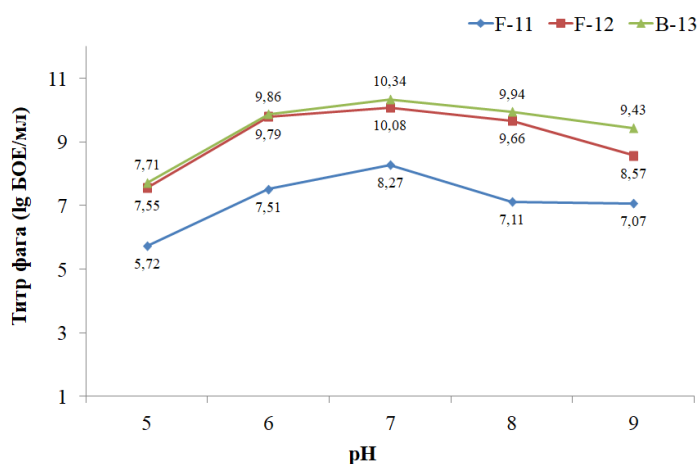


Рис. 4 - Оптимизация условий роста бактериофагов по показателю рН

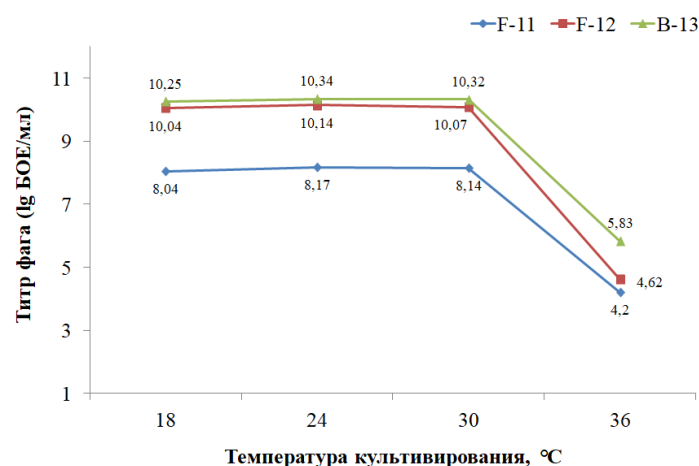


Рис. 5 - Оптимизация условий роста бактериофагов по показателю температуры культивирования

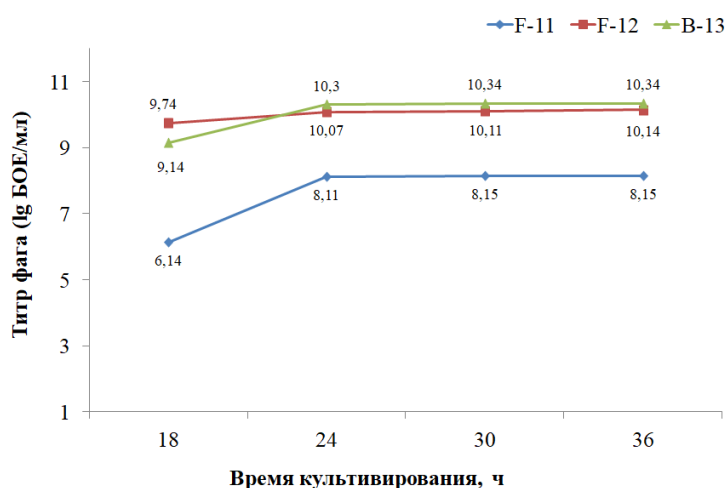


Рис. 6 - Оптимизация условий роста бактериофагов по показателю времени культивирования

рН=7, T=28 °C, t=24 ч).

Результаты эксперимента показали, что наилучшее соотношение между индикаторной культурой *L. monocytogenes* и изолированными

Таблица 1

Литическая активность листериозных бактериофагов

№	Название изучаемого биологического свойства	Результат изучения характерных биологических свойств литических листериозных бактериофагов		
		F-11	F-12	B-13
1	Литическая активность, БОЕ/мл (по Грация) при выделении	$2,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$
2	Литическая активность, БОЕ/мл (по Грация) после 5 циклов непрерывного пассирования	$1,4 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^{10}$
3	Литическая активность (по методу Аппельмана) после пассирования	10^{-7}	10^{-9}	10^{-9}
4	Спектр литического действия на культуре (по Отто) после пассирования	++	+++	+++

Таблица 2

Диапазон литического действия и специфичность листериозных бактериофагов

Род (вид) бактерий	Кол-во исслед-ых штаммов	Бактериофаги					
		F-11		F-12		B-13	
		% лизируемых культур	Количество штаммов	% лизируемых культур	Количество штаммов	% лизируемых культур	Количество штаммов
<i>L.monocytogenes</i>	14	78,5	11	71,4	10	92,8	13
<i>L.ivanovii</i>	3	–	0	–	0	–	0
<i>L.innocua</i>	2	–	0	–	0	–	0
<i>L.seeligeri</i>	2	–	0	–	0	–	0
<i>L.welshimeri</i>	1	–	0	–	0	–	0
<i>L.murrayi</i>	1	–	0	–	0	–	0
<i>L.grayi</i>	1	–	0	–	0	–	0
<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	1	–	0	–	0	–	0
<i>Jonesia dentrificans</i>	1	–	0	–	0	–	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	–	0	–	0	–	0
<i>Rhodococcus equi</i>	1	–	0	–	0	–	0

бактериофагами составляло 10:1 соответственно (MOI 0,1). Оптимальные температура и время инкубации составляли 24°C и 30 часов соответственно. Наилучший уровень pH питательной среды составлял 7. Результаты оптимизационных тестов показаны на рисунках 4-6.

Подобрав оптимальные условия роста выделенных вирулентных бактериофагов, активных в отношении бактерий вида *Listeria monocytogenes*, определили их литическую активность. Результаты исследований отражены в таблице 1.

Результаты изучения специфичности и

диапазона литического действия показали, что выделенные бактериофаги не способны лизировать культуры гетерологичных родов и видов. Негативные колонии формировались только на питательной среде, содержащей *L. monocytogenes*. Для подтверждения широкого спектра действия выделенных бактериофагов в отношении бактерий *Listeria monocytogene* было проведено исследование на 14 культурах. Установлено, что спектр составляет от 71,4% до 92,8%.

Результаты представлены в таблице 2.

Обсуждение

Не смотря на большое количество опубликованных статей, посвященных выделению бактериофагов для целей биоконтроля *Listeria monocytogenes*, следует отметить, что в нашей работе были выделены первые литические листериозные бактериофаги в РФ из образцов сточных вод [18]. Наиболее важной причиной выбора этого объекта исследований для выделения специфических бактериофагов была их большая бактериальная нагрузка, присутствие различных типов бактерий в сточных водах и, как следствие, присутствие специфических бактериофагов. В этом исследовании были оптимизированы наиболее важные факторы, влияющие на рост бактериофагов и образование негативных колоний. Результаты экспериментов показали, что оптимальная температура инкубации и время роста выделенных бактериофагов составляет 24°C и 30 часов соответственно при MOI 0,1 и pH = 7. Полученные результаты сходны с выводами Marzban A. с соавт., которые установили, что наилучшие температура инкубации и время оптимального роста листериозных фагов были 37°C и 36 ч соответственно при pH 7 [19]. В представленном исследовании титр фаголизатов составил от $1,4 \pm 0,1 \times 10^8$ до $2,1 \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, что также согласуется с данными, полученными другими исследователями [19-20].

Результаты проведенных экспериментов

показали, что выделенные и селектированные фаги специфичны для *Listeria monocytogenes*. Диапазон их литического действия при этом составил от 71,4% до 92,8%.

На следующих этапах работы нами будут изучены морфология выделенных бактериофагов, их строение и лизогенный цикл.

Выводы

Проведенные исследования свидетельствуют о возможности дальнейшего использования изучаемых вирулентных бактериофагов, активных в отношении бактерий вида *Listeria monocytogenes*, в качестве средства обработки готовой к употреблению продукции животного и растительного происхождения с целью увеличения сроков ее хранения и профилактики пищевых отравлений.

Библиографический список

1. Low J.C. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis / Low J.C., Donachie W. // *Vet J.* - 153. - 1997. - P. 9-29.
2. George L.W. *Listeriosis* // Large animal internal medicine. - St Louis (MO): Mosby. - 2002. - P. 946-949.
3. Barbuddhe, S. B. *Listeria* as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen / Barbuddhe S. B., Chakraborty, T. // *Molecular mechanisms of bacterial infection via the gut.* - 2009. - C. 173-195
4. Dhama, K. *Listeria monocytogenes* infection in poultry and its public health importance with special reference to food borne zoonoses / Dhama, K., Verma, A.K., Rajagunalan, S., Kumar, A., Tiwari, R., Chakraborty, S. and Kumar, R. // *Pakistan journal of biological sciences.* - 16(7). - 2013. - C. 301-308.
5. OIE. *Listeria monocytogenes*. Chapter 2.9.7. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.* - 2014. - p. 1-18. URL: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>
6. Dhama K. et al. *Listeriosis* in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review // *Veterinary Quarterly.* - 2015. - T. 35. - №. 4. - C. 211-235.
7. Pal M. et al. *Listeriosis*: an emerging food-borne disease of public health concern // *Journal of Advances in Microbiology Research.* - 2022. - T. 3. - №. 2. - C. 29-33.
8. Jamali H. et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets // *BMC microbiology.* - 2015. - T. 15. - C. 1-7.
9. Wiczorek K., Bomba A., Osek J. Whole-genome sequencing-based characterization of *Listeria monocytogenes* from fish and fish production environments in Poland // *International Journal of Molecular Sciences.* - 2020. - T. 21. - №. 24. - C. 9419.
10. Dos Santos J. S., Biduski B., Dos Santos L. R. *Listeria monocytogenes*: Health risk and a challenge for food processing establishments // *Archives of Microbiology.* - 2021. - C. 1-13.
11. Masebe R. D., Thantsha M. S. Anti-biofilm activity of cell free supernatants of selected lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* isolated from avocado and cucumber fruits, and from an avocado processing plant // *Foods.* - 2022. - T. 11. - №. 18. - C. 2872.
12. Kljujev I. et al. *Listeria monocytogenes*—Danger for health safety vegetable production // *Microbial Pathogenesis.* - 2018. - T. 120. - C. 23-31.
13. Kayode A. J., Okoh A. I. Incidence and genetic diversity of multi-drug resistant *Listeria monocytogenes* isolates recovered from fruits and vegetables in the Eastern Cape Province, South Africa // *International Journal of Food Microbiology.* - 2022. - T. 363. - C. 109513.
14. Shamloo E. et al. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance // *Iranian journal of veterinary research.* - 2019. - T. 20. - №. 4. - C. 241.
15. Bigot B. et al. Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage // *Food Microbiology.* - 2011. - T. 28. - №. 8. - C. 1448-1452.
16. Sanlibaba P., Buzrul S. Control of *Listeria monocytogenes* in milk by using phage cocktail // *Scientia Agropecuaria.* - 2022. - T. 13. - №. 1. - C. 7-14.
17. Kawacka I. et al. Effectiveness of phage-based inhibition of *Listeria monocytogenes* in food products and food processing environments // *Microorganisms.* - 2020. - T. 8. - №. 11. - C. 1764.
18. Strydom A., Witthuhn C. R. *Listeria monocytogenes*: a target for bacteriophage biocontrol // *Comprehensive reviews in food science and food safety.* - 2015. - T. 14. - №. 6. - C. 694-704.
19. Marzban A., Beiranvand M., Sedighi-Khavidak S. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages from Wastewater against *Listeria monocytogenes* // *International Journal of Medical Laboratory.* - 2022.
20. Anderson B. et al. Enumeration of bacteriophage particles: Comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR-and nano-sight-based assays // *Bacteriophage.* - 2011. - T. 1. - №. 2. - C. 86-93.

ISOLATION AND OPTIMIZATION OF GROWTH CONDITIONS OF VIRULENT BACTERIOPHAGES LISTERIA MONOCYTOGENES

Suldina E. V.¹, Larionova O. S.²

¹FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017. Ulyanovsk, Novy Venets Boulevard, 1, tel.: 89374545651

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

² FSBEI HE Vavilov University

410012. . Saratov, prospect named after Pyotr Stolypin p. 4, b.3.

e-mail: larionova1@mail.ru

Keywords: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, listeria, listeriosis, zoonosis, infection, food pathogens, bacteriophage, bacterium.

Listeriosis is an infectious disease caused by *Listeria monocytogenes*, which is characterized by a high percentage of mortality. The causative agent of this important zoonosis is often isolated from animal and plant products, which indicates a direct link between human listeriosis and the circulation of *L. monocytogenes* in farm animals and in the environment. Bacteriophages of lytic nature have been recognized as a useful means of biocontrol of pathogens (including *L. monocytogenes*) in food industry. In this regard, the purpose of the research was to isolate, select and optimize the growth conditions of specific virulent bacteriophages active against *L. monocytogenes*. In total, 3 pure phage lines of lytic nature were isolated from 16 wastewater samples: F-11, F-12 and B-13.

The most important factors affecting the growth of bacteriophages have been optimized. The experimental results showed that the optimal incubation temperature and growth time of isolated bacteriophages is 24°C and 30 hours at MOI 0,1 and pH = 7. Phagolysate titer was from $1,4 \pm 0,1 \times 10^8$ to $2,1 \pm 0,1 \times 10^{10}$ PFU/ml (by Grazia) and from 10^7 to 10^9 (by Appelman). The study of the specificity and range of lytic action showed that the isolated bacteriophages lyse bacteria of the species *Listeria monocytogenes* within 71,4%-92,8%, and they are not able to annihilate cultures of heterologous genera and bacteria species.

The conducted studies indicate the possibility of further use of the studied bacteriophages as a means of processing fruit and vegetable and other ready-to-eat products in order to increase its shelf life and prevent food poisoning.

Bibliography:

1. Low J.C. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis / Low J.C., Donachie W. // *Vet J.* - 153. - 1997. - P. 9-29.
2. George L.W. *Listeriosis* // *Large animal internal medicine*. - St Louis (MO): Mosby. - 2002. - P. 946-949.
3. Barbuddhe, S. B. *Listeria as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen* / Barbuddhe S. B., Chakraborty, T. // *Molecular mechanisms of bacterial infection via the gut*. - 2009. - C. 173-195
4. Dhama, K. *Listeria monocytogenes* infection in poultry and its public health importance with special reference to food borne zoonoses / Dhama, K., Verma, A.K., Rajagunalan, S., Kumar, A., Tiwari, R., Chakraborty, S. and Kumar, R. // *Pakistan journal of biological sciences*. - 16(7). - 2013. - C. 301-308.
5. OIE. *Listeria monocytogenes*. Chapter 2.9.7. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. - 2014. - p. 1-18. URL: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>
6. Dhama K. et al. *Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review* // *Veterinary Quarterly*. - 2015. - T. 35. - №. 4. - C. 211-235.
7. Pal M. et al. *Listeriosis: an emerging foodborne disease of public health concern* // *Journal of Advances in Microbiology Research*. - 2022. - T. 3. - №. 2. - C. 29-33.
8. Jamali H. et al. *Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of Listeria species and Listeria monocytogenes isolated from open-air fish markets* // *BMC microbiology*. - 2015. - T. 15. - C. 1-7.
9. Wiecek K., Bomba A., Osek J. *Whole-genome sequencing-based characterization of Listeria monocytogenes from fish and fish production environments in Poland* // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2020. - T. 21. - №. 24. - C. 9419.
10. Dos Santos J. S., Biduski B., Dos Santos L. R. *Listeria monocytogenes: Health risk and a challenge for food processing establishments* // *Archives of Microbiology*. - 2021. - C. 1-13.
11. Masebe R. D., Thantsha M. S. *Anti-biofilm activity of cell free supernatants of selected lactic acid bacteria against listeria monocytogenes isolated from avocado and cucumber fruits, and from an avocado processing plant* // *Foods*. - 2022. - T. 11. - №. 18. - C. 2872.
12. Kljujev I. et al. *Listeria monocytogenes—Danger for health safety vegetable production* // *Microbial Pathogenesis*. - 2018. - T. 120. - C. 23-31.
13. Kayode A. J., Okoh A. I. *Incidence and genetic diversity of multi-drug resistant Listeria monocytogenes isolates recovered from fruits and vegetables in the Eastern Cape Province, South Africa* // *International Journal of Food Microbiology*. - 2022. - T. 363. - C. 109513.
14. Shamloo E. et al. *Importance of Listeria monocytogenes in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance* // *Iranian journal of veterinary research*. - 2019. - T. 20. - №. 4. - C. 241.
15. Bigot B. et al. *Control of Listeria monocytogenes growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage* // *Food Microbiology*. - 2011. - T. 28. - №. 8. - C. 1448-1452.
16. Sanlibaba P., Buzrul S. *Control of Listeria monocytogenes in milk by using phage cocktail* // *Scientia Agropecuaria*. - 2022. - T. 13. - №. 1. - C. 7-14.
17. Kawacka I. et al. *Effectiveness of phage-based inhibition of Listeria monocytogenes in food products and food processing environments* // *Microorganisms*. - 2020. - T. 8. - №. 11. - C. 1764.
18. Strydom A., Witthuhn C. R. *Listeria monocytogenes: a target for bacteriophage biocontrol* // *Comprehensive reviews in food science and food safety*. - 2015. - T. 14. - №. 6. - C. 694-704.
19. Marzban A., Beiranvand M., Sedighi-Khavidak S. *Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages from Wastewater against Listeria monocytogenes* // *International Journal of Medical Laboratory*. - 2022.
20. Anderson B. et al. *Enumeration of bacteriophage particles: Comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR-and nanosight-based assays* // *Bacteriophage*. - 2011. - T. 1. - №. 2. - C. 86-93.