

## Оценка потенциала фага FBC – 216 УлГАУ для биоконтроля *Bacillus cereus*

**Е. В. Сульдина**<sup>✉</sup>, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза

**Н. А. Феоктистова**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**А. В. Мاستиленко**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**П. С. Майоров**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017. г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1;

<sup>✉</sup>e.suldina2006@yandex.ru

**Резюме.** В статье представлены результаты разработки мультиплексной системы на основе метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для детекции специфических фрагментов генов гемолизина Hly, энтеротоксина HBL/NHE и цитотоксина CytK2 в геноме бактериофага FBC 216 УлГАУ, активного в отношении бактерий вида *Bacillus cereus*. Бактериофаг FBC 216 УлГАУ выделен из пробы почвы сельскохозяйственного назначения и селектирован с конечной концентрацией  $11,36 \pm 0,02$  lg БОЕ/мл, имеет строгую специфичность в отношении бактерий вида *Bacillus cereus*, широкий диапазон литической активности – 89 % и высокую устойчивость к воздействию факторов внешней среды (температура, кислотность). Фаг FBC 216 УлГАУ показал высокую стабильность при хранении в температурном диапазоне от -20°C до 22°C в течение 6 мес. как в жидкой форме, так и в лиофильно-высушенном состоянии и продемонстрировал бактерицидный эффект *in vitro* в отношении *Bacillus cereus* при множественности инфекции (MOI) 0,01. В системе NCBI были определены полные нуклеотидные последовательности генов гемолизина (Hly), энтеротоксина (HBL/NHE) и цитотоксина (CytK2). На консервативные участки указанных генов были подобраны праймеры и зонды, проведен синтез и оптимизация праймеров в мультиплексной системе ПЦР в реальном времени. В результате экспериментов в селектированном бактериофаге FBC 216 УлГАУ специфических фрагментов, кодирующих основные факторы патогенности *Bacillus cereus* гемолизин (Hly), энтеротоксин (HBL/NHE) и цитотоксин (CytK2), не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале фага FBC 216 УлГАУ для использования его в составе биопрепарата для биоконтроля *Bacillus cereus*.

**Ключевые слова:** *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, бактериофаги, поливалентный биопрепарат, дезинфекция, биологическая дезинфекция, пищевой патоген, фаг, бактерии.

**Для цитирования:** Сульдина Е. В., Феоктистова Н. А., Мاستиленко А. В., Майоров П. С. Оценка потенциала фага FBC – 216 УлГАУ для биоконтроля *Bacillus cereus* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2024. № 1. (65). С. 125-132. doi:10.18286/1816-4501-2024-1-125-132

## Assessment of FBC – 216 ULGAU phage potential for biocontrol of *Bacillus cereus*

**E. V. Suldina**<sup>✉</sup>, **N. A. Feoktistova**, **A. V. Mastilenko**, **P. S. Mayorov**

FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

432017 Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard 1

<sup>✉</sup>e.suldina2006@yandex.ru

**Abstract.** The article presents results of the development of a multiplex system based on the polymerase chain reaction method in real time for detection of specific fragments of Hly hemolysin, HBL/NHE enterotoxin and CytK2 cytotoxin genes in the genome of FBC 216 ULGAU bacteriophage, active against bacteria of *Bacillus cereus* species. FBC 216 ULGAU bacteriophage was isolated from an agricultural soil sample and selected with a final concentration of  $11.36 \pm 0.02$  lg PFU/ml, it has strict specificity for bacteria of *Bacillus cereus* species, a wide range of lytic activity - 89% and high resistance to environmental external factors (temperature, acidity). FBC 216 ULGAU phage showed high stability when stored in the temperature range from -20°C to 22°C for 6 months, both in liquid form and in a freeze-dried state and demonstrated a bactericidal effect *in vitro* against *Bacillus cereus* at infection multiplicity of (MOI) 0.01. The complete nucleotide sequences of the hemolysin (Hly), enterotoxin (HBL/NHE) and cytotoxin (CytK2) genes were determined in the NCBI system. Primers and probes were selected for conservative regions of these genes, and primers were synthesized and optimized in a multiplex real-time PCR system. As a result of experiments in the selected FBC 216 ULGAU bacteriophage, specific fragments encoding the main pathogenicity factors of *Bacillus cereus* hemolysin (Hly), enterotoxin

(HBL/NHE) and cytotoxin (CytK2) were not identified. The data obtained indicate the high potential of FBc 216 ULSAU phage for its use as part of a biological product for biocontrol of *Bacillus cereus*.

**Keywords:** *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, bacteriophages, polyvalent biological product, disinfection, biological disinfection, food pathogen, phage, bacteria.

**For citation:** Sul'dina E. V., Feoktistova N. A., Mastilenko A. V., Mayorov P. S. Assessment of FBC – 216 ULGAU phage potential for biocontrol of *Bacillus cereus* // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2024;1(65): 125-132 doi:10.18286/1816-4501-2024-1-125-132

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

##### Введение

Безопасность пищевых продуктов, особенно связанная с действием микроорганизмов, является важной проблемой общественного здравоохранения, которую нельзя игнорировать [1]. Среди различных микробных агентов *Bacillus cereus* считается важным патогеном пищевого происхождения. Это грамположительная бактерия с высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды благодаря своей способности к споруляции [2]. В благоприятных условиях из споры прорастает вегетативная форма клетки, способная вызывать болезни пищевого происхождения [3]. Бактерии вида *Bacillus cereus* вызывают особую озабоченность из-за производимых ими энтеротоксинов и других факторов вирулентности, которые способствуют вспышкам пищевых отравлений [4]. Из-за своего повсеместного распространения, *B. cereus* может загрязнять различные пищевые продукты, включая пастеризованное молоко [5, 6], готовые к употреблению пищевые продукты [7], морепродукты [8] и овощи [9-11].

Пищевая промышленность обычно борется с *B. cereus* физическими и химическими методами, однако применение традиционных методов часто непомерно увеличивает затраты, влияет на наличие остаточных загрязняющих веществ, которые снижают качества конечного продукта [12], в том числе сенсорные, может влиять на здоровье человека и загрязнение окружающей среды. Таким образом, необходимы новые эффективные стратегии борьбы с контаминацией, вызванной *B. cereus*.

В последние годы бактериофаги снова приобрели популярность как эффективное средство контроля патогенов и борьбы с ними [13]. Фаги – это вирусы, способные инфицировать и элиминировать бактерии, что может использоваться для борьбы с инфекциями и бактериальными загрязнениями. Фаги размножаются в организме хозяина, что значительно снижает стоимость их применения. В настоящее время выделено и эффективно используется в пищевых продуктах множество бактериофагов, которые специфически воздействуют на патогены пищевого происхождения, такие как *Cronobacter* [14] и *Salmonella* [15]. Однако, до недавнего времени ученые не проявляли значительного интереса к фагам, активным в отношении *B. cereus* [16]. В настоящее время только несколько таких фагов тщательно

изучены, следовательно, есть необходимость в поиске новых штаммов фагов *B. cereus* и оценке их потенциала в качестве средства биоконтроля патогена в пищевых продуктах и на поверхностях, контактирующих с ними.

Одним из ключевых моментов в оценке производственно-перспективных фагов после изучения их биологических свойств является поиск в геноме фагов специфических фрагментов, кодирующих факторы патогенности. Основные факторы патогенности *Bacillus cereus* связаны с гемолизинем [14], энтеротоксином (HBL/NHE) и цитотоксином [18].

Цель исследования – разработка мультиплексной системы ПЦР-РВ для детекции специфичных фрагментов генов гемолизина Hly, энтеротоксина HBL/NHE и цитотоксина CytK2 в геноме бактериофага FBc 216 УлГАУ, активного в отношении бактерий вида *Bacillus cereus* и являющегося кандидатным для включения в состав комбинированного средства.

##### Материалы и методы

Объектом исследования стал выделенный и охарактеризованный по биологическим свойствам бактериофаг FBc 216 УлГАУ, строго специфичный в отношении бактерий вида *Bacillus cereus*. Фаг был выделен из пробы почвы сельскохозяйственного назначения и селектирован с конечной концентрацией  $11,36 \pm 0,02$  Ig БОЕ/мл. Литическая активность бактериофага оставалась стабильной в широких диапазонах температуры (4...90°C). Бактериофаг FBc 216 УлГАУ показал высокую стабильность при хранении в температурном диапазоне от –20°C до 22°C в течение 6 мес. как в жидкой форме, так и в лиофильно-высушенном состоянии. Фаг продемонстрировал бактерицидный эффект *in vitro* в отношении *Bacillus cereus* при множественности инфекции (МОИ) 0,01.

Полные нуклеотидные последовательности генов гемолизина Hly, энтеротоксина HBL/NHE и цитотоксина CytK2 определяли в системе NCBI. Множественное выравнивание генов проводили в Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0.

Праймеры и пробы были сконструированы в системе Primer Blast NCBI.

Выделение ДНК осуществляли с помощью набора реагентов «РеалБест УниМаг» (Вектор Бест, Россия).

```
>NZ_CP017060.1:c5327787-5327140 Bacillus cereus strain FORC_047 chromosome,
complete genome
ATGAATAC TTATGT AAGGGA ACCAGT TAACGCATTTA CTCCT TAGGTGGAGCGATATTATCATTATTG
CCTTATTAGCTATGCTTGTGAAAGTT TCTAT TAAGAT GCCATCATTGCTGCAATTACAGCTGTTATTTT
GTTTGGTATTGGAA TGATGGTCCTTTATACGGCGTCAGCTGTG TATCATAGTGT TGTGGCCAATGAACGT
GTTATTTA CTCTT TAGGAAGCTAGATCATT CTATGATTTTTATATTAATTGCAGGTACATATGCAACCT
TTTGCTTGATTACA TTAAT TCAGCAAGTGGTTACTATTATT TTGTTTAGTCTATGCAACTGCGATTG
TGGCATTGTAITTTAAAATGT TTTGGT TTAAT TGTCCAAGATGGTTATCGACAGCAATTTATATTACGATG
GGTTGGTT AATTGT TTTATT CTTTGCACCGT TAGCTGAGAATT TAAGTACAGGAGGCATTATTTCTTAG
TACTTGGAGGCATT TTTTATACAATT GGTGGATTTAT TTATGGAACAAA GCCAAAATGGT TAGAATTTAA
ATATATGGGCATCATGAAA TTTTTCATGTT TTTGTA TTATTAGGTAGT CTTCGCGCATT TCTAAGTGT
TATTGTTACGTAAT TTA
```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность гена гемолизина *Bacillus cereus*

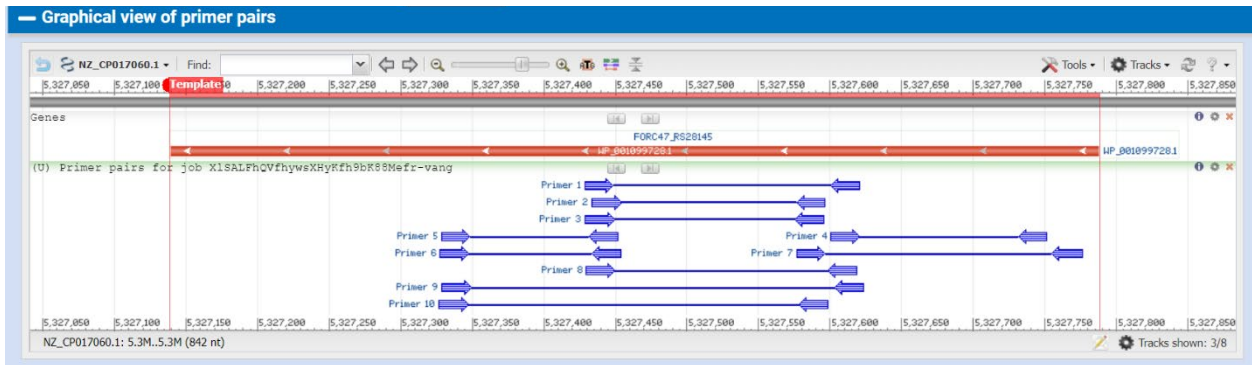


Рис. 2. Система олигонуклеотидов для детекции гена гемолизина *Bacillus cereus* (схема фланкирования специфических участков)

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACAATGCCACAATCGCAGT	Plus	20	5327429	5327448	59.04	45.00	3.00	2.00
Reverse primer	TACGGCGTCAGCTGTGATC	Minus	20	5327620	5327601	59.90	55.00	6.00	0.00
Internal oligo	ACACGTTTCATGGCCACAACACT	Plus	23	5327576	5327598	57.67	47.83		
Product length	192								

Products on intended targets

>CP130491.1 Bacillus cereus strain T chromosome, complete genome

product length = 192

Forward primer	1	ACAATGCCACAATCGCAGT	20
Template	5270225	.....	5270244
Reverse primer	1	TACGGCGTCAGCTGTGATC	20
Template	5270416	.....	5270397

>CP135060.1 Bacillus cereus strain B126\_1 chromosome, complete genome

Рис. 3. Система олигонуклеотидов для детекции гена гемолизина *Bacillus cereus*

```
>NZ_CP017060.1:1781859-1782938 Bacillus cereus strain FORC_047 chromosome,
complete genome
ATGCAGAAAAGTTT TTATAAAAAATGTCCTTT TAGCGGTAATGATTGCTGGGGTGCCAACGAGTAACGCAT
TCCCTTTACATCCT TTTGACGACAGAACAAA TGTAAGGTGCTACAAGAAAATGTGAAAACTATT CTCT
TGGACCAGCTGGAT TCCAAGATGTAA TGGCA CAAACAACATCAAGTATA TTTGC AATGGATTCATA TGCA
AAATTAAT TCAAAA TCAACAAGAGACGGATT TAAGTAAAATAAGTT CGA TTAAT AGTGAA TTTAAAGGA
ATATGATT CAGCAT CAAAGA GATGCAAAAGT TAATGCAGCATA TTGGTT AAATAATATGAAGCCTCAAAT
TATGAAAACGGATCAAATA TTATTAATTACAATAAT ACTTTCCAATCT TATTA TAATGA CATGTTAATA
GCGATTGATCAAAA GGATAG CGGAAAAAT TAAAAGCGGATTTAGAAAAGT TGTAT GCGGAT ATTGTAAAGA
ATCAAAAAT GAGGTA GATGGA TTATTA GGGAAA TTTGAAAGCTTT TCGCGATAGAA TGGCGAAAGATA CAAA
TAGTTTCAAAGAGGATACAAATCAGT TAACAGCGATA TTGGCAAGTACGAATGCTGGTAT TCCAGCTCTA
GAGCAACAATAAAA TACATA TAACGATTCCAA TTA AAAAGAGTAATGATA TGGTCAATTGCT GGTGGCGTAC
TTTGGTGA GCGCTAATAACA TGTCTT GCTGGCGGGCC GATGAT TGCGGT TCGGAAAAAGATATCGCAAA
TGCAGAAA GAGAAA TCGCCAATTTAAAAGATAGAAT TCAGGAGCACAAGCAGAAGTCTT AATTTT GACT
GATGTAAAAATAAAA CAACAACAAAT GACAGAAAACA TTGATG CAGCAATACAGCACTA CAAAACATAT
CAAATCAA TGGTATACAGTA GGTGCAAAAATA TAATAA TTTACT ACAAAA CGTAAAAGGAA TTTACTCAGA
AGAGTTTACGTTTA TAAAAGAAGATT TACAT ACAGCGAAAGAT AGCTGGAAGA TGTAAGGATTA TACA
GAAAAAT TACATGAAGGTGT GGCAAA GTAA
```

Рис. 4. Нуклеотидная последовательность гена энтеротоксина HBL/NHE *Bacillus cereus*

### 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки)

Для постановки ПЦР применяли реакционную смесь «БиоМастер» (Биолампис, Россия) и стандартный набор лабораторного оборудования и расходных материалов.

#### Результаты

В системе NCBI была определена последовательность гена гемолизина (Hly) для *Bacillus cereus* (рис. 1).

Выявили, что последовательность гена, кодирующего гемолизин *Bacillus cereus* как фактор патогенности имеет полную гомологию с участком, кодирующим аналогичный фактор патогенности в геноме *Bacillus thuringensis*. Таким образом, определена вероятность горизонтального переноса данной последовательности между этими видами.

В системе NCBI Primer Blast была сконструирована система олигонуклеотидов (праймеров и зонда) (рис. 2, 3) для детекции специфической последовательности, характерной для гена

гемолизина. В качестве флуоресцентной метки зонда TaqMan для ПЦР в реальном времени был использован краситель FAM с гасителем BHQ-1.

Относительно гена энтеротоксина *Bacillus cereus* в системе NCBI была определена его нуклеотидная последовательность (рис. 4).

При множественном выравнивании было выявлено, что последовательность гена, кодирующего энтеротоксин *Bacillus cereus*, имеет 97 % совпадения с аналогичной последовательностью в геноме *Bacillus thuringensis*. Это объясняется тем, что последний входит в группу близкородственных видов под общим наименованием «*cereus group*».

Были сконструированы праймеры (рис. 5, 6) и зонд для детекции специфической последовательности, характерной для гена энтеротоксина HBL/NHE. В качестве флуоресцентной метки зонда TaqMan для ПЦР в реальном времени был использован краситель VIC с гасителем BHQ-2.

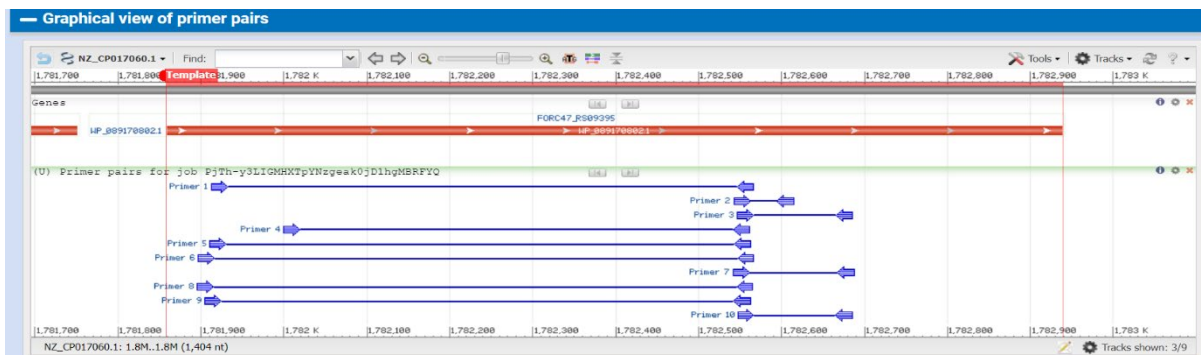


Рис. 5. Система олигонуклеотидов для детекции гена энтеротоксина HBL/NHE *Bacillus cereus* (схема фланкирования специфических участков)

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCAACGAGTAACGCATTCCC	Plus	20	1781913	1781932	59.90	55.00	5.00	3.00
Reverse primer	TACGCAAGTACGCCACCAG	Minus	20	1782566	1782547	60.67	55.00	4.00	1.00
Internal oligo	AGCTTTTCGCGATAGATGGCGA	Plus	23	1782386	1782408	57.28	47.83		
Product length	654								
<b>Products on intended targets</b>									
>CP017060.1 <i>Bacillus cereus</i> strain FORC_047, complete genome									
product length = 654									
Forward primer	1	GCAACGAGTAACGCATTCCC	20						
Template		1781913	.....	1781932					
Reverse primer	1	TACGCAAGTACGCCACCAG	20						
Template		1782566	.....	1782547					
>CP011153.1 <i>Bacillus cereus</i> strain CMCC P0011, complete genome									

Рис. 6. Система олигонуклеотидов для детекции гена энтеротоксина HBL/NHE *Bacillus cereus*

```
>NZ_CP017060.1:cl095875-1094865 Bacillus cereus strain FORC_047 chromosome,
complete genome
ATGAATCGTTCTAAAACATA TTTAAAAATGTT TAGCAT TATCCGCTGTTT TTGCTAGTAGCGCTGTA ACTC
TTTCAACA CCTGCTGCTTAC GCTCAAACGACGTCACAAGTTGT AACAGATATCGGACAAAATGCGAAAAC
ACATACGAGCTATAATACAT TTAATAATGAT CAAGCTGATAATATGACAATGTCTTTAAAAGGTAAC TTTT
ATCCGATGACCCCAAGCGCTGATAAACAGATTGCGGTTA TTAATACAACTGGTAGT TTTCTAAAAGCAAATC
CTACTATAAGTGATGCACCTATTGAT AACTACCCAAAT CCCTGGCGCTAGTGCAACATTACGTTATC CTTC
ACAATATGATGTTGCATTTAACCTTC AAGATAACAGCGCTCGT TTTCTTTAACGTAGCACCACAAA TGCT
GTAGAAGAAAACGACTGTAAACATCTAGCGTAT CTTATCAACTTGGTGGCT CTGTTAAGGCT TCTGTAACGC
CTAATGGACCCAGCGGTGAAAGCTGGT GCAACTGGTCAAGTCAC TTGGTCGGACT CTGTAA GCTATAAACA
AATAGTATTAAAAA CAAATTTAATTTGACCAAAACAAAACAAAACG TAAAAA TGGAAACGTAATCTTTAA CGGA
TATAACAATCAAAA CTGGGGTATTTA CACACGTGATT CTTATCATTCTT TATATGGAACCAA CTGTTCA
TGTACTCTCGCACA TACCTATATGAA TCTGATGCAAAAAGTAA TTTAATACCGATGGATCAACTTC CAGC
ACTAACAAATAGCGGTTTCTCTCTGGTATGATCGCT GTTGTATCTCT GAAAAAAATACAGATCAATCT
AACTTACAAGTCGCTTATACAAAACA CGCCGACGACTACCAACTTCGTCAGGCTACACATTTGGAAC TG
CAAACTGGGTTGGAACAACG TAAAA GACGTGATCAAAAACATTTAATAAAT TGTTCACACTAGATTG
GAAGAATAAGAAAT TAGTAGAAAAAATAA
```

Рис. 7. Нуклеотидная последовательность гена CytK2 *Bacillus cereus*



Рис. 8. Система олигонуклеотидов для детекции гена CytK2 *Bacillus cereus* (схема фланкирования специфических участков)

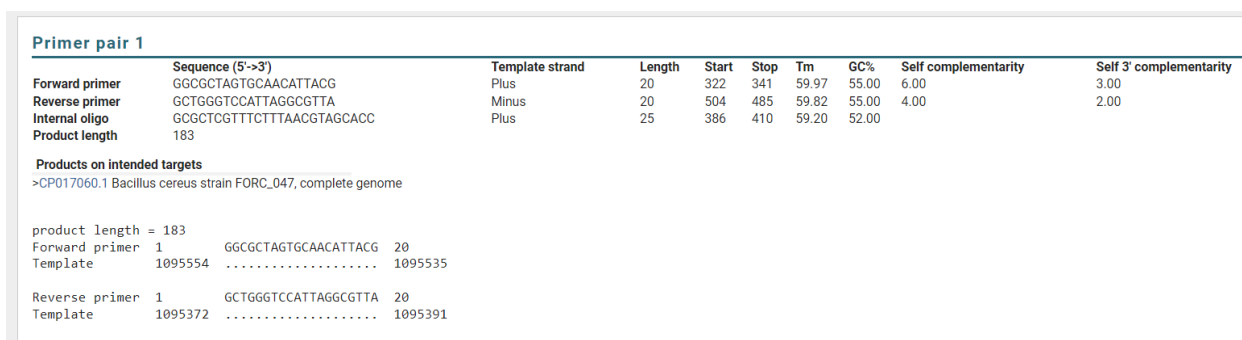


Рис. 9. Система олигонуклеотидов для детекции гена CytK2 *Bacillus cereus*

При множественном выравнивании гена цитотоксина CytK2 для *Bacillus cereus* установлено, что его последовательность (рис. 7) имеет 96,4% сходство с последовательностью гена цитотоксина бактерий группы «*cereus*».

Для детекции специфической последовательности, характерной для гена CytK2 в системе NCBI Primer Blast, была сконструирована система олигонуклеотидов (праймеров и зонда) (рис. 8, 9) с флуоресцентной меткой зонда TaqMan использован краситель ROX с гасителем BHQ-2.

После синтеза и оптимизации праймеров в мультиплексной системе ПЦР в реальном времени проведены эксперименты по детекции специфических фрагментов генов гемолизина (Hly), энтеротоксина (HBL/NHE) и цитотоксина (CytK2) в геноме изолированного бактериофага FBc 216 УлГАУ (табл. 1, рис. 10-12), специфичного в отношении *Bacillus cereus* и являющегося кандидатным для включения в состав комбинированного фагового препарата для биологической дезинфекции.

Были подобраны оптимальные показатели цикла для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с флуоресцентным зондом:

1. Предварительная денатурация – 95°C – 5 минут – 1 цикл
2. Денатурация – 95°C в течение 5 сек. Отжиг – 60°C в течении 15 сек – 40 циклов.

Таблица 1. Результаты амплификации при детекции консервативных участков генов гемолизина Hly (FAM), энтеротоксина HBL/NHE (HEX/VIC), цитотоксина CytK2 (ROX) в ДНК бактериофага FBc 216 УлГАУ, специфичного в отношении *Bacillus cereus*

Номер лунки	Идентификатор пробы	Cp, Fam	Cp, Hex	Cp, Rox	
1.	A1	FBc 216 УлГАУ			
2.	A2	FBc 216 УлГАУ			
3.	A3	FBc 216 УлГАУ			
4.	B9	<i>Bacillus cereus</i> (+)	24,0	24,8	25,5
5.	C9	<i>Bacillus cereus</i> (+)	24,1	22,8	
6.	G8	<i>Bacillus cereus</i> (+)	28,3	28,8	

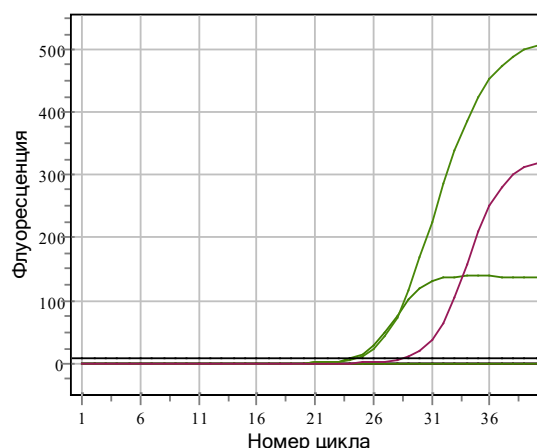


Рис. 10. Результаты амплификации при детекции консервативного участка гена гемолизина Hly (FAM), в ДНК бактериофага FBc 216 УлГАУ, специфичного в отношении *Bacillus cereus*

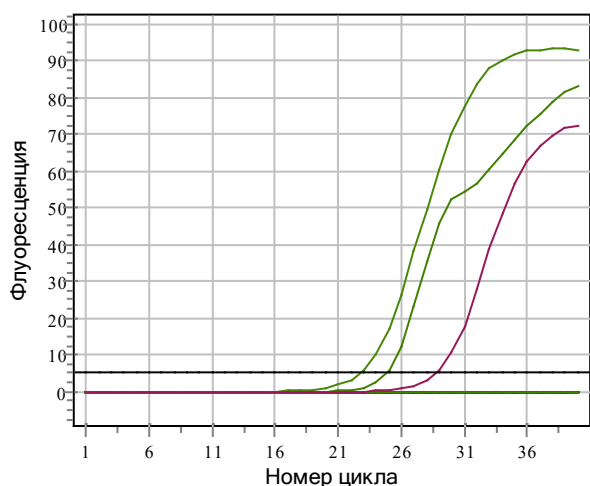


Рис. 11. Результаты амплификации при детекции консервативного участка гена энтеротоксина HBL/NHE (HEX/VIC) в ДНК бактериофага FBc 216 УлГАУ, специфичного в отношении *Bacillus cereus*

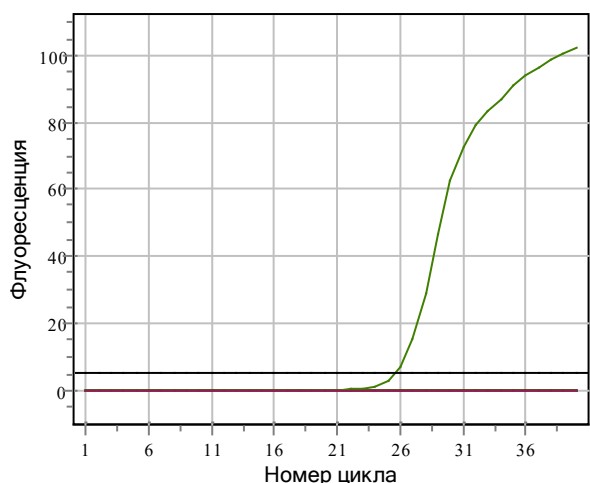


Рис.12. Результаты амплификации при детекции консервативного участка гена цитотоксина CytK2 (ROX) в ДНК бактериофага FBc 216 УлГАУ, специфичного в отношении *Bacillus cereus*

В результате проведенных экспериментов в геноме бактериофага FBc 216 УлГАУ специфичных фрагментов генов гемолизина, энтеротоксина HBL/NHE и цитотоксина CytK2, кодирующих основные факторы патогенности бактерий вида *Bacillus cereus*, не выявлено.

#### Литература

1. Food safety considerations and research priorities for the cultured meat and seafood industry / K. J. Ong, J. Johnston, I. Datar et al. / Comprehensive reviews in food science and food safety. 2021. T. 20. №. 6. С. 5421-5448. doi: 10.1111/1541-4337.12853.
2. Huang Y., Flint S. H., Palmer J. S. *Bacillus cereus* spores and toxins—The potential role of biofilms // Food microbiology. 2020. Vol. 90. P. 103493. doi: 10.1016/j.fm.2020.103493.
3. Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus* / N. Jessberger, M. Kranzler, C. Da Rioli et al. // Food microbiology. 2019. Vol. 84. P. 103276. doi:10.1016/j.fm.2019.103276.
4. *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host–pathogen interactions / D. E. Tuipulotu, A. Mathur, C. Ngo et al. // Trends in Microbiology. 2021. Vol. 29. No. 5. P. 458-471. doi: 10.1016/j.tim.2020.09.003.

#### Обсуждение

Бактериофаги признаны перспективным средством для формирования биологической антимикробной стратегией при контроле патогенов в пищевом производстве [19]. Всё чаще появляются новые варианты применения фагов для контроля патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и производственных средах. Описан бактериофаг FBc 216 УлГАУ, активный в отношении *Bacillus cereus*. При изучении биологических свойств фага FBc 216 УлГАУ установили, что фаг обладает высокой литической активностью  $11,36 \pm 0,02$  lg БОЕ/мл, значительной устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды и стабильностью при хранении, что свидетельствует о его потенциале для достижения прогнозируемого антимикробного эффекта. В ранее проведенных исследованиях большинство фагов *Bacillus* имели узкий диапазон литической активности и были способны воздействовать только на ограниченное число штаммов [16, 20]. Однако, фаг FBc 216 УлГАУ обладает широким спектром действия и способен инфицировать 89 % бактериальных штаммов.

Фаги часто несут интегразы, гены устойчивости к антибиотикам или гены вирулентности, но в проведенном исследовании генов, кодирующих основные факторы патогенности бактерий вида *Bacillus cereus* в геноме бактериофага FBc 216 УлГАУ, не выявлено.

Фаг FBc 216 УлГАУ может быть использован для биологической дезинфекции в пищевой промышленности и биоконтроля *Bacillus cereus* в пищевых продуктах как самостоятельно, так и в составе комбинированного средства для более эффективного удаления патогенов на производственных линиях [21].

#### Заключение

В результате проведенных исследований по детекции специфичных фрагментов генов гемолизина (Hly), энтеротоксина (HBL/NHE) и цитотоксина (CytK2), кодирующих основные факторы патогенности бактерий вида *Bacillus cereus* в геноме бактериофага FBc 216 УлГАУ с помощью мультиметрической системы ПЦР-РВ, таковых не выявлено. Полученные данные подтверждают высокий потенциал фага FBc 216 УлГАУ для использования его в составе биопрепарата для биоконтроля *Bacillus cereus*.

5. Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China / T. Gao, T. Gao, Y. Ding, Q. Wu et al. // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 533. doi: 10.3389/fmicb.2018.00533
6. Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China // X. Y. Liu, Q. Hu, F. Hu et al. // *Toxins*. 2020. Vol. 12. No. 7. P. 454. doi: 10.3390/toxins12070454
7. Prevalence and antimicrobial-resistant characterization of *Bacillus cereus* isolated from ready-to-eat rice products in Eastern China // J. Chen, J. Zhang, L. Zhan et al. // *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 13. P. 964823. doi: 10.3389/fmicb.2022.964823
8. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data / C. Chen et al. // *Molecular plant*. 2020. Vol. 13. No. 8. P. 1194-1202.
9. *Bacillus cereus* isolated from vegetables in China: incidence, genetic diversity, virulence genes, and antimicrobial resistance / P. Yu et al. // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 948. doi:10.3389/fmicb.2019.00948.
10. Olaimat A. N., Holley R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review // *Food microbiology*. 2012. Vol. 32. No. 1. P. 1-19. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.016.
11. Food of plant origin: production methods and microbiological hazards linked to food-borne disease. Reference: CFT/EFSA/BIOHAZ/2012/01 Lot 1 (Food of plant origin with high water content such as fruits, vegetables, juices and herbs) / E. Hackl et al. // *EFSA Supporting Publications*. 2013. Vol. 10. No. 4. P. 402E. doi: 10.2903/sp.efsa.2013.EN-402
12. Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: a comprehensive review / L. Z. Deng et al. // *Critical reviews in food science and nutrition*. 2020. Vol. 60. No. 15. P. 2481-2508. doi: 10.1080/10408398.2019.1649633.
13. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review // *International journal of antimicrobial agents*. 2019. Vol. 53. No. 1. P. 16-21. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004.
14. Novel phage vB\_CtuP\_B1 for controlling *Cronobacter malonaticus* and *Cronobacter turicensis* in ready-to-eat lettuce and powdered infant formula / H. Zeng et al. // *Food Research International*. 2021. Vol. 143. P. 110255. doi:10.1016/j.foodres.2021.110255.
15. Application of a novel phage vB\_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods / Y. Guo et al. // *Food Research International*. 2021. Vol. 147. P. 110492. doi:10.1016/j.foodres.2021.110492/
16. A novel *Bacillus cereus* bacteriophage DLn1 and its endolysin as biocontrol agents against *Bacillus cereus* in milk / N. Li et al. // *International Journal of Food Microbiology*. 2022. Vol. 369. P. 109615. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109615.
17. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II / Z. I. Budarina et al. // *Microbiology*. 2004. Vol. 150. No. 11. P. 3691-3701. doi: 10.1099/mic.0.27142-0
18. Phelps R. J., McKillip J. L. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. Vol. 68. No. 6. P. 3147-3151. doi: 10.1128/AEM.68.6.3147-3151.2002.
19. Endersen L., Coffey A. The use of bacteriophages for food safety // *Current Opinion in Food Science*. 2020. Vol. 36. P. 1-8. doi: 10.1016/j.cofs.2020.10.006.
20. Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China / X. Y. Liu et al. // *Toxins*. 2020. Vol. 12. No. 7. P. 454. doi: 10.3390/toxins12070454.
21. Understanding and exploiting phage-host interactions / E. Stone, K. Campbell, I. Grant et al. // *Viruses*. 2019. Vol. 11. P. 567. doi: 10.3390/v11060567.

## References

1. Food safety considerations and research priorities for the cultured meat and seafood industry / K. J. Ong, J. Johnston, I. Datar et al. // *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2021. T. 20. No. 6. C. 5421-5448. doi: 10.1111/1541-4337.12853.
2. Huang Y., Flint S. H., Palmer J. S. *Bacillus cereus* spores and toxins—The potential role of biofilms // *Food microbiology*. 2020. Vol. 90. P. 103493. doi: 10.1016/j.fm.2020.103493.
3. Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus* / N. Jessberger, M. Kranzler, C. Da Rioli et al. // *Food microbiology*. 2019. Vol. 84. P. 103276. doi:10.1016/j.fm.2019.103276.
4. *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host–pathogen interactions / D. E. Tuipulotu, A. Mathur, C. Ngo et al. // *Trends in Microbiology*. 2021. Vol. 29. No. 5. P. 458-471. doi: 10.1016/j.tim.2020.09.003.
5. Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China / T. Gao, T. Gao, Y. Ding, Q. Wu et al. // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 533. doi: 10.3389/fmicb.2018.00533
6. Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China // X. Y. Liu, Q. Hu, F. Hu et al. // *Toxins*. 2020. Vol. 12. No. 7. P. 454. doi: 10.3390/toxins12070454

#### 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки)

---

7. Prevalence and antimicrobial-resistant characterization of *Bacillus cereus* isolated from ready-to-eat rice products in Eastern China // J. Chen J. Zhang, L. Zhan et al. // *Frontiers in microbiology*. 2022. Vol. 13. P. 964823. doi: 10.3389/fmicb.2022.964823
8. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data / C. Chen et al. // *Molecular plant*. 2020. Vol. 13. No. 8. P. 1194-1202.
9. *Bacillus cereus* isolated from vegetables in China: incidence, genetic diversity, virulence genes, and antimicrobial resistance / P. Yu et al. // *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 948. doi:10.3389/fmicb.2019.00948.
10. Olaimat A. N., Holley R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review // *Food microbiology*. 2012. Vol. 32. No. 1. P. 1-19. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.016.
11. Food of plant origin: production methods and microbiological hazards linked to food-borne disease. Reference: CFT/EFSA/BIOHAZ/2012/01 Lot 1 (Food of plant origin with high water content such as fruits, vegetables, juices and herbs) / E. Hackl et al. // *EFSA Supporting Publications*. 2013. Vol. 10. No. 4. P. 402E. doi: 10.2903/sp.efsa.2013.EN-402
12. Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: a comprehensive review / L. Z. Deng et al. // *Critical reviews in food science and nutrition*. 2020. Vol. 60. No. 15. P. 2481-2508. doi: 10.1080/10408398.2019.1649633.
13. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review // *International journal of antimicrobial agents*. 2019. Vol 53. No. 1. P. 16-21. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004.
14. Novel phage vB\_CtuP\_B1 for controlling *Cronobacter malonaticus* and *Cronobacter turicensis* in ready-to-eat lettuce and powdered infant formula / H. Zeng et al. // *Food Research International*. 2021. Vol. 143. P. 110255. doi:10.1016/j.foodres.2021.110255.
15. Application of a novel phage vB\_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods / Y. Guo et al. // *Food Research International*. 2021. Vol 147. P. 110492. doi:10.1016/j.foodres.2021.110492/
16. A novel *Bacillus cereus* bacteriophage DLn1 and its endolysin as biocontrol agents against *Bacillus cereus* in milk / N. Li et al. // *International Journal of Food Microbiology*. 2022. Vol. 369. P. 109615. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109615.
17. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II / Z. I. Budarina et al. // *Microbiology*. 2004. Vol. 150. No. 11. P. 3691-3701. doi 10.1099/mic.0.27142-0
18. Phelps R. J., McKillip J. L. Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. Vol. 68. No. 6. P. 3147-3151. doi 10.1128/AEM.68.6.3147-3151.2002.
19. Endersen L., Coffey A. The use of bacteriophages for food safety // *Current Opinion in Food Science*. 2020. Vol. 36. P. 1-8. doi 10.1016/j.cofs.2020.10.006.
20. Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China / X. Y. Liu et al. // *Toxins*. 2020. Vol. 12. No. 7. P. 454. doi 10.3390/toxins12070454.
21. Understanding and exploiting phage-host interactions / E. Stone, K. Campbell, I. Grant et al. // *Viruses*. 2019. Vol. 11. P. 567. doi 10.3390/v11060567.