

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 579.26:635.1/8-035.2

**ДЕТЕКЦІЯ ЕНТЕРОТОКСИГЕННИХ *BACILLUS CEREUS*  
У РОСЛИННІЙ СИРОВИНІ**

**Г. Ямборко<sup>1\*</sup>, Л. Пилипенко<sup>2</sup>, І. Пилипенко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна  
e-mail: jamborko@mail.ru

<sup>2</sup>Одеська національна академія харчових технологій  
вул. Канатна, 112, Одеса 65039, Україна

Своєчасне виділення й ідентифікація бактерій роду *Bacillus* – представників епіфітної мікробіоти рослинної сировини – є необхідним кроком для прогнозування і гарантування безпеки рослинної продукції та дає змогу оперативно вносити корективи у технологічний процес консервування, а це, у свою чергу, забезпечує відповідність продуктів харчування міжнародним стандартам. У результаті досліджень розроблено методику підготовки зразків харчових продуктів і оптимізовано параметри полімеразно-ланцюгової реакції з підібраними групо- і видоспецифічними праймерами для діагностики у тестованих зразках регламентованих бацилярних контамінантів, які впливають на безпеку продукції – штамів *Bacillus cereus*. Полімеразна ланцюгова реакція зі специфічними праймерами *nhe A F* і *nhe A R*, підібраними до ділянки гена *nhe A*, підтвердила приналежність усіх тестованих штамів, виділених із рослинної сировини та консервів, до виду *Bacillus cereus*; розмір ампліконів становив 553 п.о. Температура 50 °С виявилася оптимальною для відпалу праймерів *nhe AF* та *nhe AR* гена до *nhe A B. cereus*. Мінімальна кількість клітин *B. cereus*, яку можна виявити у рослинній сировині методом ПЛР, дорівнює 10<sup>2</sup>КУО/мл, що свідчить про високу чутливість ПЛР.

*Ключові слова:* безпека рослинної продукції, полімеразна ланцюгова реакція, ентеротоксигенні *Bacillus cereus*

Підвищення ризиків захворювання від їжі пов'язане з поширенням і накопиченням традиційних та емерджентних мікроорганізмів у зв'язку з новими технологіями переробки, пакування і тривалого зберігання сировини, з використанням продукції із географічно віддалених від виробника країн та ін. [1]. При контролюванні санітарної безпеки харчових продуктів особливу увагу приділяють умовно-патогенним і патогенним мікроорганізмам, тоді як спороутворювальні мікроорганізми вивчають тільки за показником мезофільних анаеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФАНМ). Однак, за даними науковців, деякі мікроорганізми цієї групи не є індиферентними і здатні спричинити псування продукції та харчові отруєння; значна частина цих отруєнь обумовлена ентеротоксигенними штамми *Bacillus cereus* [5, 10]. Класичні методи дослідження даних мікроорганізмів тривалі та трудомісткі, потребують виділення чистої культури з визначенням комплексу властивостей для ідентифікації та дають змогу провести лише умовну видову діагностику виділених мікроорганізмів. Тому мета роботи – провести молекулярно-генетичну діагностику ентеротоксигенних бактерій групи *B. cereus* у зразках рослинної сировини – овочів, фруктів, ягід – і продуктів її переробки півдня України.

### Матеріали та методи

Для імітації інфікування та пошуку бактерій і їхніх ДНК у зразках рослинної продукції використовували штами мікроорганізмів із колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова і кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування Одеської національної академії харчових технологій: *Bacillus cereus* ATCC 11778; *B. cereus* ATCC 10702; *B. cereus* УКМ В-5650; *B. cereus* УКМ В-5671; *Paenibacillus polymyxa* В-5760<sup>Т</sup>; *P. macerans* В-5803<sup>Т</sup>, *Geobacillus stearothermophilus* ВКМ В-718, а також штами бацил, що були ізольовані з рослинної сировини, районованої в Україні та вирощеної в Одеській області (морква, перець болгарський, баклажани, томати, кабачки), та з консервів з ознаками псування («Гриби натуральні відварені», «Сік морквяний», «Ікра кабачкова»).

**Попередня обробка зразків.** Для досліджень були використані свіжий зелений горошок, салат, зелений горошок консервований і яблучний сік консервований. Зі свіжої рослинної сировини брали змиви із середньої проби стерильним фізіологічним розчином згідно з нормативними рекомендаціями [3]. Усі консервовані зразки їжі раніше були підтверджені як такі, що не були контаміновані *B. cereus*, чашковим методом Коха. Зразки рідини, отриманої з консервів і рослинної сировини, було інокульовано добовою культурою кожного зі штамів бацил ( $\sim 10^8$  КУО/мл) у співвідношенні 1:1. Тестовані штами вирощували у серцево-мозковому бульйоні (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) протягом 24 год за температури 30 °С.

Надалі дослід проводили у трьох варіантах: 1) 1,5 мл рідини, інокульованої бактеріями, без попередньої обробки брали для виділення ДНК; 2) 2,5 мл рідини, інокульованої бактеріями, центрифугували для видалення суспензії залишків органічних речовин 2 хв при 2000 об/хв, після чого зразки фільтрували крізь нітроцелюлозні мембранні фільтри «Millipore» (діаметр пор 0,22 мкм); 3) 2,5 мл рідини, інокульованої бактеріями, піддавали подвійному центрифугуванню за обраними параметрами. Після центрифугування відбирали 1,5 мл осаду. Для швидкого виділення з фільтра і очищення ДНК бактеріальних клітин використовували набір F1021 (SureFast<sup>®</sup> PREP Bacteria, CONGEN Biotechnologie GmbH, Germany).

**Визначення *B. cereus* за допомогою ПЛР.** Детекція ДНК бактерій у зразках рослинної продукції та визначення приналежності досліджуваних штамів до бактерій групи *B. cereus* у процесі імітації інфікування тестованої сировини проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції за методом Park і співавт. [12]. Склад суміші для проведення ПЛР: 10хПЛР буфер – 2 мкл, 50 мМ MgCl<sub>2</sub> – 0,8 мкл, 2,5 мМ дНТФ – 1,6 мкл, Taq-полімераза (5 Од/мкл) – 0,4 мкл, загальний об'єм суміші ПЛР – 20 мкл. Цикли ПЛР: первинна денатурація – 94 °С 5 хв, 30 циклів ампліфікації при денатурації 94 °С 30 с, відпалі при 63 °С 30 с, елонгації при 72 °С 30 с, та фінальна елонгація 72 °С 5 хв. Реакцію проводили в ампліфікаторі BioRad (США).

Використовували такі пари специфічних олігонуклеотидних праймерів для гена *groEL*, який характерний для всіх штамів групи *Bacillus cereus*: BCGSH – 1F GTGCGAAC-ССААТGGGTCTTC, BCGSH – 1R CCTTGTGTACCACTTGCTC [6, 12]. Як негативний контроль використовували ПЛР-суміш без ДНК. Візуальну оцінку розміру утворених ампліконів проводили з використанням маркерів молекулярної ваги (pBR322/BsuRI, Fermentas, Латвія).

Для детекції ентеротоксигенних штамів *B. cereus* у зразках було використано такі комбінації штамів бактерій: 1) суміш штамів *B. cereus* для імітації виявлення природного

забруднення; 2) суміш штамів *B. cereus*, *Paenibacillus polymyxa* і *P. macerans* для виявлення окремих видів у суміші.

Для проведення молекулярно-генетичної діагностики бацилярних контамінантів за допомогою ПЛР використовували пару специфічних олігонуклеотидних праймерів (nhe AF AAGGCGAATGTACGAGAGTGG, nhe AR CTTCTCTCGTTTGACATCTGCAG), які були обрані на підставі даних літератури [9] та синтезовані ТОВ НПФ «Сіместа ВААЛ» (Одеса, Україна) для ентеротоксичного гена *nhe A*, характерного для всіх ентеротоксигенних штамів виду *Bacillus cereus*. Оптимізацію температури відпалу ПЛР-ампліфікації здійснювали, використовуючи формулу

$$T_m = [(A + T) \times 2^\circ \text{C}] + [(G + C) \times 4^\circ \text{C}] \quad [7],$$

з урахуванням того, що сумарна довжина олігонуклеотиду не перевищує 20 основ.

Для виявлення чутливості ПЛР під час індикації ентеротоксигенних бактерій групи *B. cereus* було застосовано вісім десятикратних розведень суміші добових культур штамів *B. cereus* у рослинній консервованій продукції:  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  КУО/мл. Рідину з консервованої продукції попередньо центрифугували 2 хв при 2000 об/хв для видалення залишків органічних речовин. Потім 5 мл рідини з певного розведення, інокульованої клітинами *B. cereus*, фільтрували крізь нітроцелюлозні мембранні фільтри «Milipore» (діаметр пор 0,22 мкм) для видалення залишків органічних речовин у продукті, а також для концентрування мікроорганізмів. Фільтр після фільтрації використовували для виділення ДНК з використанням експрес-набору F1021, як на попередніх етапах.

#### Результати і їхнє обговорення

Харчові отруєння, спричинені наявністю *B. cereus* у продуктах харчування як рослинного, так і тваринного та змішаного походження, реєструють практично в усіх країнах. Під час виробництва консервованих продуктів головним джерелом їхнього інфікування *B. cereus* слугує основна сировина і допоміжні матеріали. Оскільки мікроорганізми цієї групи викликають хвороби харчового походження та є потенційно ентеротоксичними для людини, здатність швидко виявляти *B. cereus* у рослинній сировині має вирішальне значення [8].

Тому на першому етапі за допомогою ПЛР підтверджували приналежність досліджених штамів, якими інокулювали тестовану сировину, до бактерій виду *B. cereus*. Усі зразки раніше були підтверджені як негативні за наявністю *B. cereus*. Використовували колекційні штами бацил *B. cereus* ATCC 11778; *B. cereus* ATCC 10702; *B. cereus* УКМ В-5650; *B. cereus* УКМ В 5671, а також штами бацил, що були ізолювані з рослинної сировини та з консервів з ознаками псування та, згідно з результатами попередніх досліджень, ідентифіковані як *B. cereus* шляхом встановлення їхніх фізіолого-біохімічних ознак і жирнокислотного складу клітин [4].

Для обрання найбільш ефективного методу попередньої обробки зразків сировини та продуктів для виявлення ентеротоксинпродукуючих бактерій виду *B. cereus* зразки інокулювали культурою кожного з досліджених штамів бацил, а подальші експерименти з виділенням ДНК бацил проводили у трьох варіантах: зразки, інокульовані бактеріями, без попередньої обробки (лунки 4, 5), зразки, які підлягали центрифугуванню для видалення органічних залишків із подальшим фільтруванням крізь нітроцелюлозні мембранні фільтри (лунки 2, 3) і зразки після подвійного центрифугування за обраними параметрами (лунки 6, 7) (рис. 1).

У разі проведення ПЛР з двома парами специфічних праймерів BCGSH усі тестовані штами *B. cereus* утворювали амплікон розміром 400 п.н. до гена *groEL*, який характерний для всіх представників групи *Bacillus cereus*.

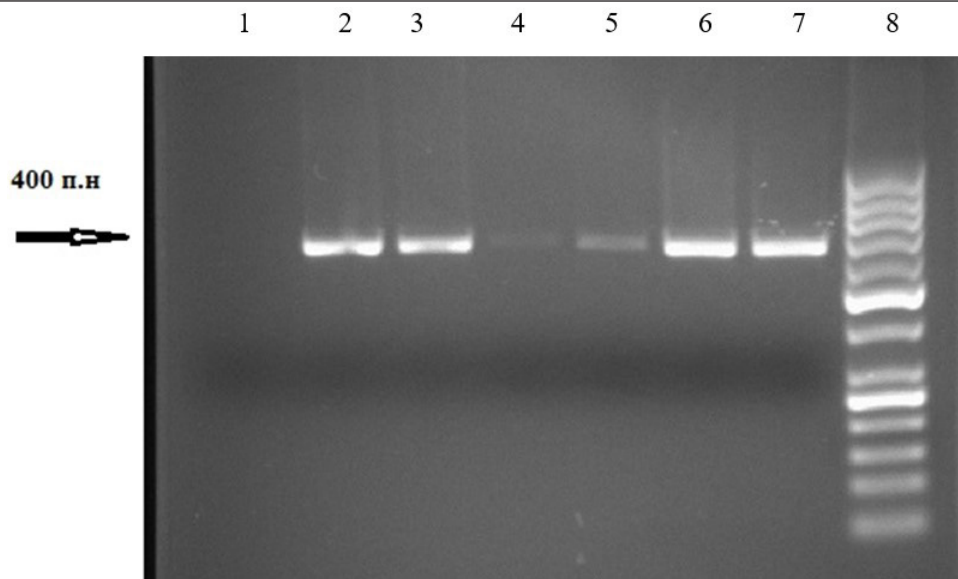


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР із ДНК штамів *B. cereus* з парою специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *groEL*: 1) негативний контроль ПЛР; 2) *B. cereus* УКМ В-5671 (центрифугування, фільтрування); 3) *B. cereus* ATCC 10702 (центрифугування, фільтрування); 4) *B. cereus* УКМ В-5671 (без попередньої обробки); 5) *B. cereus* ATCC 10702 (без попередньої обробки); 6) *B. cereus* УКМ В-5671 (подвійне центрифугування); 7) *B. cereus* ATCC 10702 (подвійне центрифугування); 8) маркери молекулярної маси (pBR322/BsuRI, Fermentas)

Таким чином, метод попередньої обробки зразків рослинної сировини і продуктів з подвійним центрифугуванням дає змогу видалити залишки органічних речовин у продуктах, а також сконцентрувати мікроорганізми. Виявлено, що основна маса мікроорганізмів міститься в осаді після другого центрифугування, що дає змогу повноцінно проводити ПЛР їх дослідження, зокрема, *B. cereus* із групо- і видоспецифічними праймерами. Даний спосіб обробки проб був визначений як пріоритетний і використовувався для подальших досліджень.

*B. cereus* викликає діарейний і блювотний синдроми, оскільки продукує різні екзотоксини, до яких належать їх три основних типи, а саме гемолізін ВЛ (HBL), негемолітичний ентеротоксин (NHE) і цитотоксин К (cyt K) [11]. Серед штамів *B. cereus* набули значного поширення ентеротоксичні гени *hbl A*, *nhe A*, *cyt K* і Fm (ентеротоксин FM). Проте ми відібрали тільки ген *nhe A* для проведення ПЛР, зважаючи на його найбільшу поширеність, яку пов'язують з основною роллю у харчових отруєннях. Результати ПЛР зі зразками продуктів, що інокульовані різними комбінаціями бактерій, з використанням специфічних праймерів *nhe A F* і *nhe A R*, наведено на рис. 2.

Полімеразна ланцюгова реакція зі специфічними праймерами *nhe A F* і *nhe A R*, підібраними до ділянки гена *nhe A*, підтвердила приналежність усіх тестованих штамів до ентеротоксигенного виду *Bacillus cereus*. Розмір ампліконів становив 553 п.н., що вказувало на належну специфічність ПЛР. У разі проведення ПЛР-аналізу ДНК колекційних штамів *Paenibacillus polymyxa* В-5760<sup>T</sup>, *P. macerans* В-5803<sup>T</sup> і *Geobacillus stearothermophilus* ВКМ В-718 з праймерами *nhe A* і в негативному контролі (ПЛР-суміш без ДНК) не було виявлено продуктів ампліфікації.

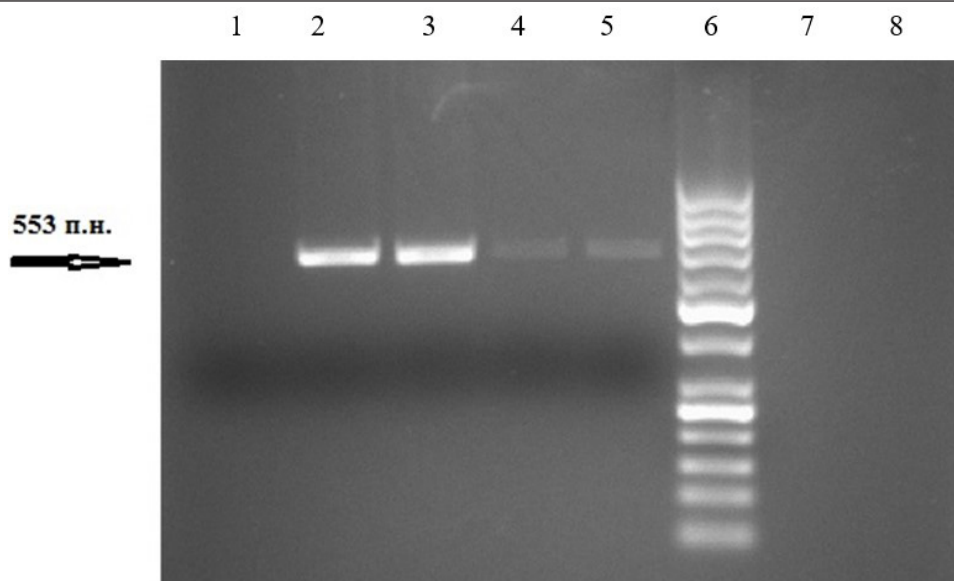


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР із ДНК штамів *B. cereus*, *P. polymyxa* і *P. macerans* з парою специфічних праймерів до гена *nhe A*: 1) негативний контроль ПЛР; 2) суміш штамів *B. cereus* (*B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* ATCC 10702, *B. cereus* УКМ В-5650, *B. cereus* УКМ В-5671); 3) суміш штамів *B. cereus*, *P. macerans* і *P. polymyxa* (*P. macerans* В-5803<sup>T</sup>, *P. polymyxa* В-5760<sup>T</sup>, *B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* ATCC 10702, *B. cereus* УКМ В-5650, *B. cereus* УКМ В-5671); 4) *B. cereus* П90-1 (з моркви); 5) *B. cereus* Л-3 (з консервів «Ікра кабачкова»); 6) маркери молекулярної маси (pBR322/BsuRI, Fermentas); 7) суміш штамів *P. polymyxa* В-5760<sup>T</sup> і *P. macerans* В-5803<sup>T</sup>; 8) *Geobacillus stearothermophilus* ВКМ В-718

Становило інтерес протестувати штами *B. cereus*, ізольовані нами з рослинної сировини та консервів, на наявність ентеротоксичного гена *nhe A*, який характерний для всіх ентеротоксигених представників виду *Bacillus cereus*. Виявлено, що при застосуванні специфічних праймерів *nhe AF* і *nhe AR* утворювалися амплікони розміром 553 п.н. у всіх досліджуваних штамів виду *B. cereus*, що вказує на наявність у цих штамів ентеротоксичного гена *nhe A*. Оскільки бактерії виду *B. cereus* поширені у зовнішньому середовищі, а саме у ґрунті, виявлення їх у змивах із поверхні рослинної сировини цілком ймовірне. Однак викликає стурбованість той факт, що ентеротоксигенний штам *B. cereus* Л-3 був ізольований нами з консервів «Ікра кабачкова». Найбільш імовірною причиною наявності цих бактерій у стерилізованих консервах може бути потрапляння їх у продукт за умов порушення герметичності тари під час стерилізації, укупорювання, тимчасової негерметичності у процесі охолодження консервів або за недотримання режимів теплової обробки.

У ході роботи було проведено оптимізацію параметра ПЛР-ампліфікацій – температури відпалу – з метою підвищення чутливості методу. Для точного розрахунку оптимальної температури відпалу праймерів *nhe AF* та *nhe AR* за їхнім нуклеотидним складом використовували рекомендовану формулу [7]. Однак розрахункова температура відпалу є приблизною і потребує експериментальної оптимізації. Варіювали температурою відпалу праймерів 48 °С, 50 °С, 54 °С. За низької температури відпалу праймерів 48 °С спостерігали велику кількість неспецифічних ампліконів. За температури відпалу 54 °С не вдалося одержати специфічні продукти ампліфікації. Температура 50 °С виявилася оптимальною для відпалу праймерів *nhe AF* та *nhe AR* гена до *nhe A Bacillus cereus*.



Видимі зміни органолептичних властивостей консервованого продукту, в якому розмножуються мікроорганізми, зазвичай спостерігають за титру бактерій не менш  $10^7$  –  $10^8$  КУО у 1 г. З цього випливає, що загальне бактеріальне обсіменіння продуктів не має перевищувати  $10^7$  КУО/г. Нормативи допустимої контамінованості продуктів збудниками харчових отруень, зокрема, ентеротоксигенним видом *B. cereus*, встановлюють за санітарно-гігієнічними показниками, які набагато нижчі  $10^7$  КУО у 1 г. Продукт, який містить збудники харчових отруень, частіше за все має нормальні органолептичні властивості [2]. Тому було проведено визначення чутливості ПЛР для виявлення клітин бацилярних контамінантів у тестованих зразках.

Для цього було підготовлено зразки продуктів зі сумішшю колекційних штамів *B. cereus* (*B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* ATCC 10702, *B. cereus* УКМ В-5650, *B. cereus* УКМ В- 5671) шляхом десятикратних розведень до концентрацій  $10^1$  –  $10^8$  КУО/мл.

У результаті проведених досліджень виявлено, що контамінацію клітинами бацил зразків рідини з консервів виявляли вже у розведенні  $10^{-2}$  (рис. 3).

1    2    3    4    5    6

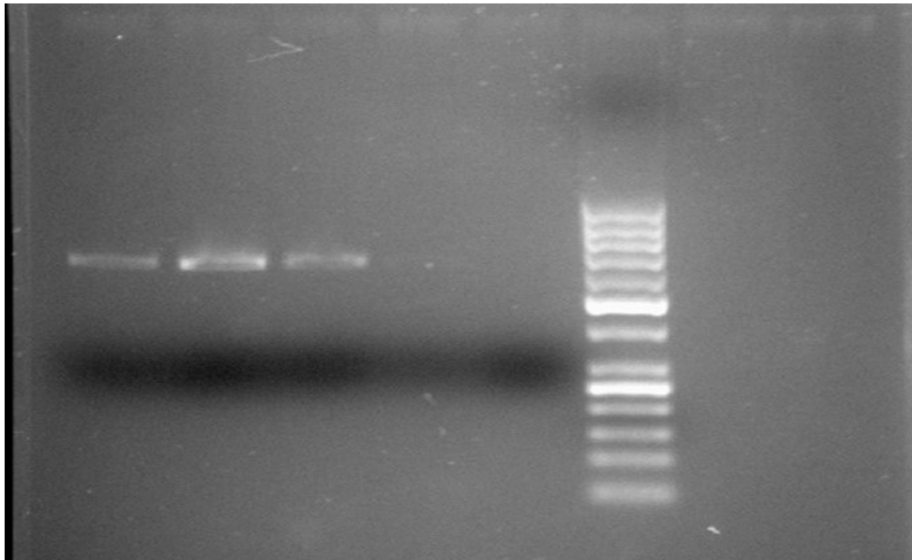


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР із ДНК штамів виду *B. cereus* з парою специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *nhe A*, з різним титром бактерій (КУО/мл): 1)  $10^4$ ; 2)  $10^3$ ; 3)  $10^2$ ; 4)  $10^1$ ; 5) негативний контроль ПЛР; 6) маркери молекулярної маси (pBR322/BsuRI, Fermentas)

Згідно з отриманими даними щодо чутливості ПЛР для виявлення клітин бацил у зразках рідини з консервів, було з'ясовано, що титр бактеріальних клітин має становити не менш  $10^2$  КУО/мл, що свідчить про високу чутливість ПЛР.

Так, полімеразна ланцюгова реакція з видоспецифічними праймерами, підібраними до ділянки гена *nhe A*, надає можливість ідентифікації окремих штамів та індивідуальних контамінантів виду *B. cereus*, на що вказувала наявність ампліконів на електрофореграмі продуктів ПЛР розміром 553 п.н., що дає можливість проводити прискорену молекулярно-генетичну діагностику бактерій виду *B. cereus* у разі контамінування консервованої продукції бацилами.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галынкин В. А., Заикина Н. А., Шевелева С. А. и др. Микробиологические основы НАССР при производстве пищевых продуктов. СПб.: Проспект науки, 2007. 350 с.
2. Джей Дж. М., Лёсснер Дж., Гольден Д. А. Современная пищевая микробиология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 886 с.
3. ГОСТ 26668-85. Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов. М.: СТАНДАРТИНФОРМ, 2008. 6 с.
4. Ямборко Г. В., Остапчук А. М., Сергеева Ж. Ю. та ін. Хемотаксономічні особливості та плазмідні профілі аеробних та факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій з овочевої продукції // Мікробіологія і біотехнологія. 2017. № 1 (37). С. 56–72.
5. Biesta-Peters E. G., Dissel S., Reij M. W. et al. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market // J. Food Prot. 2016. Vol. 79. N 2. P. 230–238.
6. Chang Y. H., Shangkuan Y. H., Lin H. C., Liu H. W. PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells // Appl. Environ. Microbiol. 2003. P. 4502–4510.
7. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. Optimization of PCRs. In PCR protocols: A guide to methods and applications // Academic Press. San Diego. 1990. P. 3–12.
8. Flores-Urbá K., Natividad-Bonifaci I., Vázquez-Quiñone, C. et al. Detection of Toxigenic *Bacillus cereus* Strains Isolated from Vegetables in Mexico City // J. Food Prot. 2014. Vol. 77. Issue 12. P. 21–44.
9. Kalyan Kumar T. D., Murali H. S., Batra H. V. Multiplex PCR assay for the detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* group strains and its application in food matrices // Indian J. Microbiol. 2010. Vol. 50. N 2. P. 165–171.
10. Kleter G. A., Parandini A., Filippi L., Marvin H. J. P. Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) // Food Chem. Toxicol. 2009. Vol. 47(5). P. 932–950.
11. Ngamwongsatita P., Buasria W., Pianariyanona P. et al. Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers // Int. J. Food Microbiol. 2008. Vol. 121. P. 352–356.
12. Park S. H., Kim H. J., Kim J. H., Kim T. W. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 17 (7). P. 1177–1182.

Стаття: надійшла до редакції 24.04.17

доопрацьована 03.07.17

прийнята до друку 10.07.17

**DETECTION OF ENTEROTOXYGENIC *BACILLUS CEREUS*  
IN VEGETABLE RAW MATERIALS**

**G. Yamborko<sup>1</sup>, L. Pylypenko<sup>2</sup>, I. Pylypenko<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Odessa I. I. Mechnikov National University  
2, Dvoryanska St., Odesa 65082, Ukraine  
e-mail: jamborko@mail.ru*

<sup>2</sup>*Odessa National Academy of Food Technologies  
112, Kanatna St., Odesa 65039, Ukraine*

The distinction and identification of bacilli – representatives of the plant raw materials epiphytic microbiota is a necessary step for forecasting and ensuring the safety of plant products. It allows to promptly make adjustments to the technological process of preservation, which ensures the accordance of food products to the international standards. The technique for preparing food samples has been developed and polymerase chain reaction parameters with selected group- and species-specific primers have been optimized. This provides a way to diagnose regulated bacillary contaminants in the test samples that affect the safety of products – *Bacillus cereus* strains. Polymerase chain reaction with specific primers nhe A F and nhe A R, selected to the site of the gene *nhe A*, confirmed the affiliation of all tested strains isolated from plant material and canned to the enterotoxigenic *Bacillus cereus* species; the size of the amplicons was 553 bp. The temperature of 50 °C was found to be optimal for the annealing of the nhe AF and nhe AR primers to *nhe A Bacillus cereus* gene. The minimum quantity of *B. cereus* cells that can be detected in the plant material by PCR is 10<sup>2</sup> CFU/ ml, which indicates a high PCR sensitivity.

*Keywords:* safety of plant products, polymerase chain reaction, enterotoxigenic *Bacillus cereus*