

УДК 579.26:635.1/8-035.2

Г.В. Ямборко¹, А.М. Остапчук¹, Ж.Ю. Сергєєва¹,
Л.М. Пилипенко², І.В. Пилипенко²¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: jamborko@mail.ru²Одеська національна академія харчових технологій, вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна

ХЕМОТАКСОНОМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ АЕРОБНИХ ТА ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНИХ СПОРОУТВОРЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ З ОВОЧЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ

Мета. Визначити деякі молекулярно-генетичні особливості потенційних збудників харчових отруєнь, псування і залишкової мікрофлори овочевих продуктів – аеробних та факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій за їх хемотаксономічними та плазмідними профілями. **Методи.** Аналіз жирних кислот досліджуваних штамів проводили методом газової хроматографії з використанням системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA). Видову належність штамів бацил, які за даними хроматографії жирних кислот мали високі, але близькі значення індексів схожості за видами *Bacillus cereus* та *B. thuringiensis*, підтверджували проведенням полімеразної ланцюгової реакції з групо- та видоспецифічними праймерами. Виділення плазмідної ДНК проводили модифікованим методом Дженсена. **Результати.** Аналіз результатів хроматографічних досліджень показав, що вміст розгалужених жирних кислот у досліджених штамів становив від 54 до 85 % від загального жирнокислотного пулу клітин, включаючи насичені та ненасичені кислоти, а також їх розгалужені структурні ізомери з переважанням ізо- $C_{15}:0$ і антеізо- $C_{15}:0$ жирних кислот. Також для досліджуваних штамів характерний високий вміст антеізо- $C_{17}:0$ та ізо- $C_{17}:0$ жирних кислот. Переважно штами видів *B. cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* та *B. pumilus* утримують плазмідні різного розміру, які представлені двома типами: невеликі плазмідні розміром від 2 до 12 т.п.о. і мегаплазмідні приблизно 200 т.п.о. **Висновки.** Досліджені штами бактерій за хемотаксономічними властивостями належали до 4 родів порядку Bacillales: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* з переважанням представників першої рРНК групи та домінуванням штамів виду *B. subtilis*. Результати жирнокислотного біомаркування штамів *Bacillus cereus* підтверджено методом ПЛР з групо- та видоспецифічними праймерами для зразків, які за результатами хроматографії жирних кислот мали високі, але близькі значення індексів схожості за видами *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Відмічені особливості жирнокислотного та плазмідного профілів досліджуваних мікроорганізмів можуть бути використані як допоміжний ключ для таксономічного розмежування бацилярних контамінантів – потенційних збудників харчових захворювань, псування і залишкової мікробіоти овочевої продукції півдня України.

Ключові слова: бацилярні контамінанти, склад жирних кислот, полімеразно-ланцюгова реакція, ідентифікація, плазмідні профілі.



В останні роки значна увага приділяється вивченню мікробних контамінантів харчових продуктів, напівфабрикатів і сировини з метою визначення їх харчової безпечності і відповідності принципам НАССР [1, 2]. Серед біологічних властивостей термостійких бактерій, особливу увагу привертає здатність певних їх видів спричиняти псування продукції та харчові отруєння. Зокрема, в США за даними Центру з контролю і профілактики захворювань значна частина зумовлена *Bacillus cereus*. При харчових токсикоінфекціях у низці випадків пацієнтам помилково діагностують як причину інтоксикації *Staphylococcus aureus* та *Clostridium perfringens* [3].

Мікробіота овочевої сировини різноманітна, однак, переважно виділяються аеробні та факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії – представники порядку *Bacillales* [4]. Постійно уточнюється класифікація мікроорганізмів роду *Bacillus* [5]. Серед них є збудники псування харчової сировини і продукції [1] і збудники харчових отруєнь [6, 7], а розроблення режимів термічної обробки харчових продуктів проводиться з урахуванням виживання термостійких видів мікроорганізмів [8]. Тому ідентифікація бацилярних контамінантів овочевої сировини та продуктів її переробки українського регіону має наукове і практичне значення.

Методи ідентифікації мікроорганізмів, що є стандартизованими в Україні та обов'язковими до використання на харчових підприємствах, пов'язані з вивченням морфо-фізіологічних, тінкторіальних та біохімічних властивостей мікроорганізмів у критичних контрольних точках технологічного процесу або залишкової мікробіоти продукції. Якісний та кількісний вміст жирних кислот мікроорганізмів є добре відтворюваною стабільною і відносно постійною індивідуальною його характеристикою. Саме тому жирнокислотний профіль бактерій можна використовувати як фінгерпринт [9, 10].

Своєчасне виділення та ідентифікація бацил – представників мікробіоти овочевої сировини та продуктів її переробки – є необхідним кроком для прогнозування і забезпечення якості овочевої продукції та дозволяє оперативно вносити корективи у технологічний процес для гарантування відповідності продуктів харчування вітчизняним та міжнародним стандартам. Тому метою роботи було визначити деякі молекулярно-генетичні особливості потенційних збудників харчових отруєнь, псування і залишкової мікробіоти овочевих продуктів – аеробних та факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій за їх хемотаксономічними та плазмідними профілями.

Матеріали і методи

Як матеріал дослідження використовували рослинну сировину, районовану в Україні та вирощену в Одеській області (морква, буряк, кабачки, баклажани), овочі відварені стерилізовані у вакуумних полімерних пакетах, сушені суміші овочів і трав та грибні консерви з ознаками псування. Для виділення аеробних і факультативно-анаеробних бактерій середню пробу прогрівали протягом 20 хв за температури $80 \pm 1^\circ\text{C}$ та після охолодження до кімнатної температури



висівали на м'ясо-пептонний агар з подальшим інкубуванням за температури 30 ± 1 °C впродовж 24–48 год [11].

Чисті культури факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій ($n=31$) вирощували на трипсин-соевому агарі (Tryptic soy agar, Merck, Germany) при 28 ± 1 °C впродовж 24 год. Підготовку проб та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали згідно стандартного протоколу. 50 мг вологої мікробної біомаси поміщали у скляні віали для подальшого руйнування клітин та омилення ліпідів мікроорганізмів. Хімічний лізис клітин та омилення проводили з 1 мл 1,125 М розчину NaOH в метанолі при 100 °C протягом 30 хв. Для наступного етапу – етерифікації у зразок вносили 2 мл 6,0 N HCl в метанолі. Реакцію проводили при 80 °C впродовж 10 хв. Метилові ефіри жирних кислот екстрагували гексаном. Проби нейтралізували 0,3 М NaOH. Хроматографічне розділення проводили на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA), колонка капілярна ULTRA 2 (25 м x 0,2 мм x 0,33 мкм), детектор полум'яно-іонізаційний, як газ-носії використовували водень. Пробу об'ємом 2 мкл вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура інжектора 250 °C. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкова температура 170 °C з градієнтом 5 °C/хв до 270 °C [12].

Вміст кожної жирної кислоти виражали у відсотках від загальної суми площ піків усіх жирних кислот. Хроматографічні піки із значеннями меншими за 0,2% не враховували. Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.21.

Видову належність трьох штамів *Bacillus sp.*, які за даними хроматографії жирних кислот мали досить високі і близькі індекси схожості за видами *Bacillus cereus* та *Bacillus thuringiensis*, підтвердили проведенням полімеразної ланцюгової реакції з використанням групо- та видоспецифічних праймерів до послідовностей бацил за методом Park et al. [13]. Використовували наступні пари праймерів: до групи *B. cereus* B C G S H – 1 F G T G C G A A C C C A A T G G G T C T T C groEL B C G S H – 1 R C C T T G T T G T A C C A C T T G C T C; до виду *B. thuringiensis* B T J H – 1 F G C T T A C C A G G G A A A T T G G C A G gyrB B T J H – R A T C A A C G T C G G C G T C G G. Для швидкого виділення і очищення ДНК бактеріальних клітин використовували набір F1021 (SureFast® PREP Bacteria, CONGEN Biotechnologie GmbH, Germany). Склад суміші для проведення ПЛР: 10xПЛР буфер – 2 мкл, 50 mM MgCl₂ – 0,8 мкл, 2,5 mM дНТФ – 1,6 мкл, Taq-полімераза (5 Од/мкл) – 0,4 мкл. Цикли ПЛР: первинна денатурація – 94 °C 5 хв, 30 циклів ампліфікації при денатурації 94 °C 30 сек, відпалі при 63 °C 30 сек, елонгації при 72 °C 30 сек, та фінальна елонгація 72 °C 5 хв. Реакцію проводили в ампліфікаторі BioRad (США).

Виділення плазмідної ДНК проводили методом Дженсена, адаптованим для виділення плазмід бактерій роду *Bacillus* [14]. Біомасу клітин ресуспендували в 100 мкл буфера Е (15% цукрози, 40 mM тріс-HCl, 2 mM EDTA pH 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм лізуючого буфера (3% додецилсульфат



натрія, 50мМ тріс-НСІ рН 12,5). Зразки інкубували за температури 60 °С впродовж 30 хв, після чого до лізату додавали 5 U протеїнази К і перемішували 20 разів. Далі інкубували 90 хв при 37 °С і після цього додавали 1 мл суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1) та ретельно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 11000 об/хв (8800g), 15 хв.

Результати та обговорення

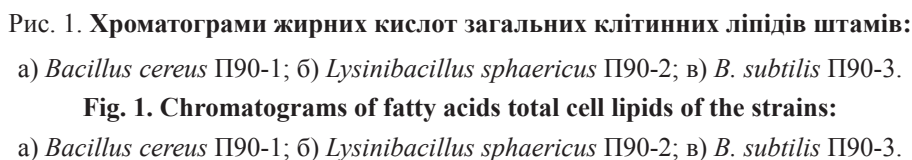
У попередніх дослідженнях показано, що аеробні та факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії, виділені з овочевої сировини та продуктів її переробки, були попередньо ідентифіковані класичними методами за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками [15].

Вивчення біологічних властивостей 31 штаму спороутворювальних бактерій овочевої сировини та консервів дозволило віднести їх до певних родів та видів порядку *Bacillales* [16]. Однак, біологічні особливості цих штамів викликають сумнів щодо точності їх ідентифікації за фенотипом, тому видову приналежність підтверджували проведенням жирнокислотного аналізу, порівнюючи їх з відомими стандартами, з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI inc., USA), застосовуючи бібліотечну базу даних.

Домінування розгалужених жирних кислот у жирнокислотному профілі є характерною ознакою бактерій порядку *Bacillales* [10, 17]. За літературними даними та результатами наших досліджень вміст розгалужених жирних кислот у бацил становив від 54 до 85% загального жирнокислотного пулу клітини, включаючи як насичені, так і ненасичені кислоти з переважанням ізо- $C_{15}:0$ і антеізо- $C_{15}:0$. Також для них є характерним високий вміст антеізо- $C_{17}:0$ і ізо- $C_{17}:0$ жирних кислот.

Аналіз хроматограми, представленої на рис. 1(а), показав, що у жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Bacillus sp.* П90-1 виявлено розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот (38,35%), із яких 33,48% припадає на 13-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ iso).

Частка 12-метилтетрадеканової кислоти ($C_{15}:0$ anteiso) від загальної площі піків складає 4,67%, ізомерів гептадеканової кислоти – 17,63%, з яких 2,49% припадає на 15-метил-6-гексадеканову кислоту ($C_{17}:1$ iso w10c), 7,17% ізомерів – на 15-метилгексадеканову кислоту ($C_{17}:0$ iso) та 5,82% 13-метил-7-гексадеканову кислоту ($C_{17}:1$ iso w9c), 1,11% – на 14-метилгексадеканову кислоту ($C_{17}:0$ anteiso). Нерозгалужені насичені жирні кислоти клітин досліджуваного штаму складають 61,65%. Частка жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю: тетрадеканової кислоти ($C_{14}:0$) та гексадеканової кислоти ($C_{16}:0$) складає відповідно 3,24% і 3,51%. Ізомерів ненасиченої гексадекенової жирної кислоти виявлено 6,04%, з яких 0,64% припадає на 9-гексадекенову кислоту ($C_{16}:1$ w7c), 5,19% – на ізомери 14-метилпентадеканової кислоти ($C_{16}:0$ iso) і 0,21% – на 5-гексадеценіву кислоту ($C_{16}:1$ w11c). Профіль загальноклітинних



Аналіз хроматограми, представленої на рис. 1(б), показав, що переважальним у жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Lysinibacillus sp.* П90-2 є розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот (62,31%), із яких 55,37% припадало на 13-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ iso). Жирнокислотні профілі штамів *Lysinibacillus sp.* П90-2, П90-8 та С1 характеризуються наявністю 21,04% ізомерів ненасиченої гексадекенової жирної кислоти, з яких 11,66% припадає на 9-гексадекенову кислоту ($C_{16}:1$ w7c), та відсутністю у клітинному складі гідроксикислот. Автоматичною системою ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA) за спектром жирних кислот досліджувані штами ідентифіковано як *L. sphaericus GC subgroup D* для штаму С1 та *L. sphaericus GC subgroup E* для штамів П90-2, П90-8 (індекси схожості – 0,723–0,906).

На відміну від *Bacillus sp.* П90-1 та *Lysinibacillus sp.* П90-2 штам *Bacillus sp.* П90-3 (рис. 1в) містить у складі профілю жирних кислот 33,77% ізомерів гептадекенової кислоти, з яких 12,66% припадає на $C_{17}:0$ iso та 11,11% – на $C_{17}:0$ anteiso) метилгексадеканові кислоти, відповідно. Переважальними в жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Bacillus sp.* П90-3 (а також штамів П90-5, ГС 1, ГС 2, ЯС- 1, КП- 14, К3, К4, К9) є розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот, із яких 34,39% припадає на 12-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ anteiso). За жирнокислотним складом досліджувані штами бацил цієї групи ідентифіковано як *Bacillus subtilis* з високими індексами схожості – 0,774–0,795. Вміст решти визначених жирних кислот та їх ізомерів серед досліджуваних штамів *B. subtilis* незначно відрізняється лише у кількісному складі.

Жирнокислотний профіль досліджуваного штаму *Bacillus sp.* П90-10 (рис. 2а) характеризується відсутністю олеїнової ($C_{18}:1$ w9c) кислоти. У складі жирнокислотного профілю цього штаму була ідентифікована 11-метилдодеканова кислота ($C_{13}:0$ iso) – 8,51%. Склад жирних кислот клітинних ліпідів штаму *Bacillus sp.* П90-7 є аналогічним штаму П90-10; обидва штами віднесено до виду *Bacillus pumilus-GC subgroup B*.

Жирнокислотний профіль досліджуваного штаму *Bacillus sp.* КК11 (рис. 2б) відрізняється від інших досліджених представників групи *Bacillus* меншою різноманітністю жирних кислот профілю клітин. Переважальними у жирнокислотному профілі *Bacillus sp.* КК11 (як і для штаму *Bacillus sp.* К5) є розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот, із яких 34,56% припадає на 12-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ anteiso). Штами *Bacillus sp.* КК11, К8 та К5 ідентифіковано як *Bacillus licheniformis* (індекси схожості – 0,774 та 0,795).

Розгалужені насичені жирні кислоти клітин штаму *Bacillus sp.* К6 (рис. 2в) складають 63,9% від усіх жирних кислот штаму. Частка жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі: тетрадеканової кислоти ($C_{14}:0$) та гексадеканової кислоти ($C_{16}:0$) складає відповідно 0,26% і 0,64%. Склад жирних кислот клітинних ліпідів штаму *Bacillus sp.* К6 був аналогічним штаму К7; обидва штами віднесено до виду *Bacillus atrophaeus*.

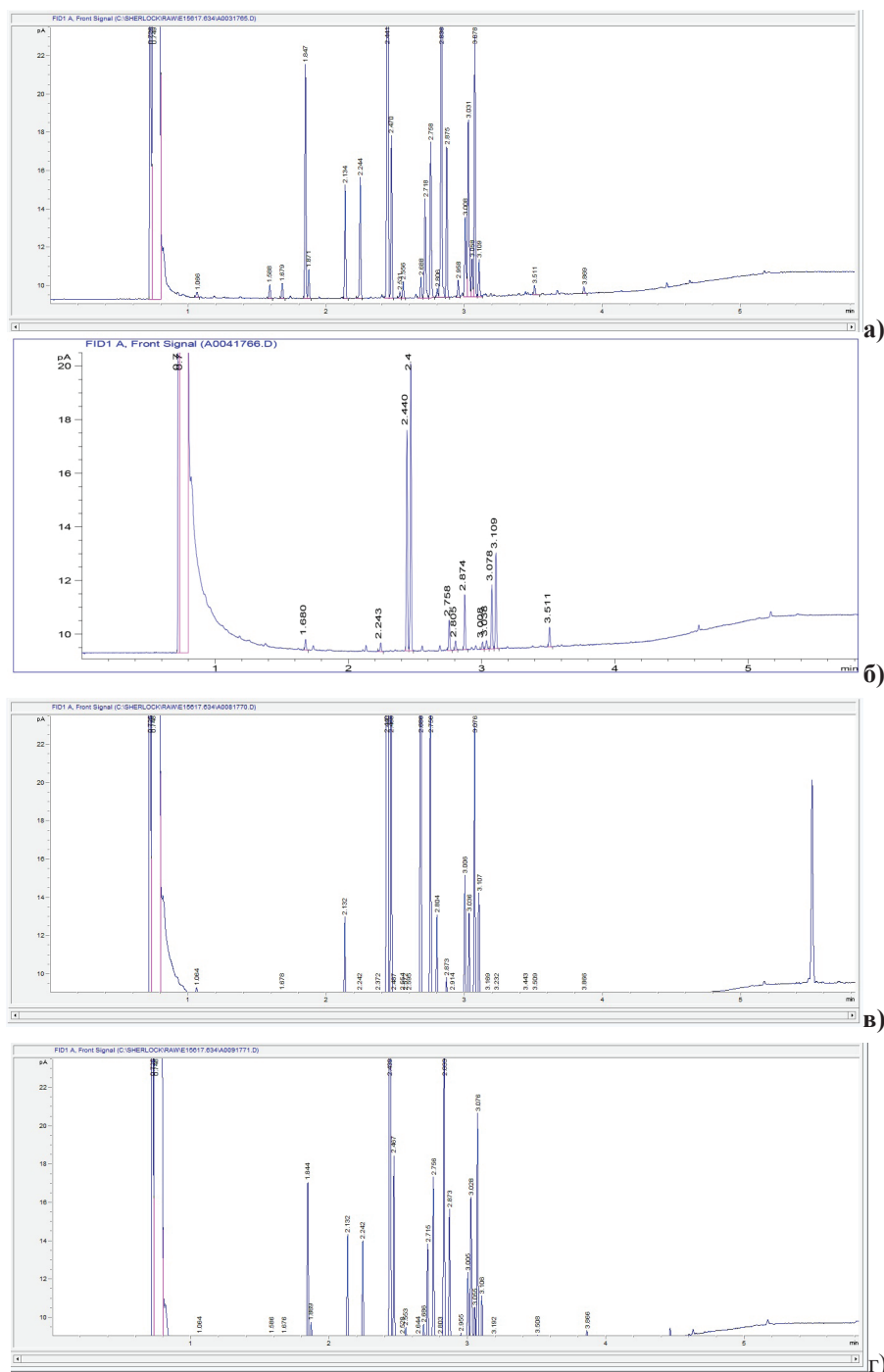


Рис. 2. Хроматограми жирних кислот загальних клітинних ліпідів штамів:
а) *Bacillus pumilus* П90-10; б) *B. licheniformis* КК11; в) *B. atrophaeus* К6;
г) *Brevibacillus choshinensis* C10.

Fig. 2. Chromatograms of fatty acids total cell lipids of the strains:
а) *Bacillus pumilus* П90-10; б) *B. licheniformis* КК11; в) *B. atrophaeus* К6;
г) *Brevibacillus choshinensis* C10.

Результати жирнокислотного складу деяких інших ізольованих штамів – представників родів *Lysinibacillus* і *Bacillus* наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Кількість основних жирних кислот (%) бактерій штамів родів
Lysinibacillus і *Bacillus*

Table 1

The main fatty acids (%) of some strains of bacteria *Lysinibacillus* and *Bacillus* genera

Жирна кислота	<i>Bacillus cereus</i> П90-4	<i>Bacillus subtilis</i> П90-5	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GC subgroup D П90-8	<i>Bacillus atrophaeus</i> К7	<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup B П90-7	<i>Bacillus licheniformis</i> К5
C ₁₂ :0	0,49	-	0,18	-	-	1,54
C ₁₃ :0 iso	6,97	-	-	-	0,33	-
C ₁₄ :0 iso	3,19	1,35	1,76	0,94	1,64	-
C ₁₄ :0	3,50	-	0,26	0,24	0,95	1,23
C ₁₅ :0 iso	34,95	24,92	55,93	15,93	36,77	26,94
C ₁₅ :0 anteiso	4,53	32,79	7,82	45,27	30,38	34,56
C ₁₆ :1w7c	0,61	-	12,11	-	0,42	-
C ₁₆ :0 iso	4,85	3,70	6,92	4,11	2,74	3,79
C ₁₆ :1 w11c	0,26	1,65	1,80	0,51	2,02	1,14
C ₁₆ :0	4,18	5,07	0,64	2,55	5,77	6,56
C ₁₇ :1 iso w10c	2,66	-	2,52	0,70	1,73	0,94
C ₁₇ :1 iso w9c	6,02	-	-	-	-	-
C ₁₇ :0 iso	7,50	12,66	5,14	7,81	5,42	7,77
C ₁₇ :0 anteiso	1,09	11,17	2,24	19,92	6,03	11,71
C ₁₈ :0	0,33	-	0,25	0,21	0,63	2,45

Примітка: «-» – не виявлена

Note: «-» – not determined.

Lysinibacillus sphaericus GC subgroup D П90-8 характеризується максимальною кількістю 13-метилтетрадеканової кислоти (C₁₅:0 iso) – 55,93%, 9-гексадеканової кислоти (C₁₆:1w7c) – 12,11% та гексадеканової кислоти (C₁₆:0 iso) – 6,92%, що незначно відрізняє його від штаму П90-2 (рис. 1б).



Особливістю досліджуваного штаму *Bacillus atrophaeus* K7 є найбільша кількість 12-метилтетрадеканової кислоти ($C_{15}:0$ anteiso) – 45,27%. Лише у жирнокислотному профілі загальних ліпідів штаму *Bacillus cereus* П90-4 порівняно з іншими ізолятами зареєстровано 15-метил-7-гексадекенову кислоту ($C_{17}:1$ iso w9c).

Встановлено, що штам *Brevibacillus* sp. C10 характеризується найбільш різноманітним складом жирних кислот (рис. 2г). На відміну від решти досліджуваних штамів, у його жирнокислотному профілі виявлено гептадеканову кислоту ($C_{17}:0$) у кількості 0,22%. Нерозгалужені жирні кислоти тетра- ($C_{14}:0$) та гексадеканова ($C_{16}:0$) виявлені у кількості 3,60 та 4,40%, відповідно. Автоматичною системою ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock за спектром жирних кислот досліджуваний штам ідентифіковано як *Brevibacillus choshinensis* з високим індексом схожості – 0,854. Жирнокислотний склад деяких інших ізольованих штамів – представників родів *Paenibacillus* та *Brevibacillus* наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Кількість основних жирних кислот (%) бактерій штамів родів
Paenibacillus і *Brevibacillus*

Table 2

The main fatty acids (%) of some strains of bacteria *Paenibacillus*
and *Brevibacillus* genera

Жирна кислота	<i>Paenibacillus</i> <i>larvae</i> ssp. <i>pulvificiens</i> ЯС-2	<i>Paenibacillus</i> <i>macerans</i> ГС 3	<i>Paenibacillus</i> <i>polymyxa</i> С12	<i>Brevibacillus</i> <i>choshinensis</i> С11
$C_{14}:0$ iso	-	-	-	3,87
$C_{14}:0$	0,98	-	-	1,05
C_{15} iso	22,24	22,26	15,37	8,68
$C_{15}:0$ anteiso	39,49	40,39	42,50	74,54
$C_{16}:0$ iso	2,22	1,69	2,63	1,25
$C_{16}:1$ w11c	-	-	-	2,18
$C_{16}:0$	9,89	9,12	16,35	2,03
$C_{17}:0$	-	-	-	0,17
$C_{17}:0$ iso	9,06	8,67	7,78	0,37
$C_{17}:0$ anteiso	10,49	14,49	12,97	1,88

Дослідженням штамам роду *Paenibacillus*, на відміну від штамів інших родів, властива найбільша кількість гексадеканової ($C_{16}:0$) та 14- метилгексадеканової ($C_{17}:0$ anteiso) кислот, та відсутністю у складі жирних кислот клітинних ліпі-



дів 12-метилтридеканової ($C_{14}:0$ iso), тетрадеканової ($C_{14}:0$) та 5-гексадеценкової ($C_{16}:1$ w11c) кислот.

Таким чином, для досліджуваних штамів отримані високі індекси схожості, що дозволило виявити їх видову належність. Так, за результатами ідентифікації шляхом встановлення жирнокислотного складу клітин спороутворювальних аеробних і факультативно-анаеробних бактерій, виділених з овочевої сировини та продуктів її переробки, вивчені штами належать до 4 родів порядку *Bacillales*: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* та *Brevibacillus* та віднесені згідно досліджень С. Ash зі співавторами [18] до 4 окремих груп за секвенування 16S рРНК (табл. 3).

Таблиця-3

Особливості жирнокислотного складу штамів бацил із овочевих продуктів

Table 3

Fatty acid composition of bacilli strains from vegetable products

Група рРНК	Вид	Кількість штамів	Особливості жирнокислотного складу
1	<i>Bacillus subtilis</i> ,	9	Жирнокислотний склад переважно представлений $C_{15}:0$ anteiso (25–66%), $C_{15}:0$ iso (22–47%), $C_{17}:0$ anteiso (2–12%) за винятком представників групи <i>B. cereus</i> , які характеризувалися підвищеним вмістом ненасичених жирних кислот (більше 10%) та меншим вмістом $C_{15}:0$ anteiso (7–12%)
	<i>B. cereus</i> GC subgroup A,	6	
	<i>B. licheniformis</i>	3	
	<i>B. pumilus</i> GC subgroup B,	2	
	<i>B. atrophaeus</i>	2	
2	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GC subgroup E	2	У жирнокислотному складі переважали $C_{15}:0$ anteiso. Також характерним для цієї групи є наявність значної кількості ненасичених жирних кислот (17–28%)
	<i>L. sphaericus</i> GC subgroup D	1	
3	<i>Paenibacillus larvae</i> ssp. <i>pulvifaciens</i>	1	Жирнокислотні профілі містили $C_{15}:0$ anteiso (66–80%), $C_{16}:0$ iso (3,5–6,6%), $C_{15}:0$ iso (10–12%) та $C_{17}:0$ anteiso (18–21%)
	<i>P. macerans</i>	2	
	<i>P. polymyxa</i>	2	
4	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	1	Характерний вміст $C_{15}:0$ iso (18–42%) та $C_{15}:0$ anteiso (32–62%)

Проведеними дослідженнями показано, що серед бацил овочевих продуктів найбільше представників першої рРНК групи з переважанням штамів виду *B. subtilis*. Ізольовані штами роду *Bacillus* за результатами жирнокислотного аналізу віднесені до видів *B. subtilis*, *B. cereus* GC subgroup A, *B. pumilus* GC subgroup B, *B. atrophaeus* та *Bacillus licheniformis*; роду *Lysinibacillus* – до виду *L. sphaericus* GC (subgroup E та D), роду *Brevibacillus* – до виду *B. choshinensis*, роду *Paenibacillus* – до видів *P. larvae* ssp. *pulvifaciens*, *P. macerans*, *P. polymyxa*.



З літературних джерел відомо, що представники групи *B. cereus* (види *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*) характеризуються високим ступенем генетичної та фенотипової спорідненості [14,19]. За результатами жирнокислотного біомаркування деякі штами *Bacillus sp.* мають досить високі і близькі індекси схожості, наприклад у зразку П90-4 цей показник становить 0,806 для *B. cereus* GC subgroup A і 0,772 – для *B. thuringiensis israelensis*. Незважаючи на рекомендації щодо індикації виду мікроорганізмів за більшим значенням індексу, було додатково перевірено точність хемотаксономічного визначення проведенням полімеразної ланцюгової реакції з використанням групо- та видоспецифічних праймерів до послідовностей бацил.

У випадку проведення ПЛР з двома парами праймерів амплікони утворюються за застосування праймерів BCGSH, що свідчить про належність тестованих штамів до групи *B. cereus*. Розмір ампліконів становить 400 п.о., що вказує на належну специфічність ПЛР (рис. 3).

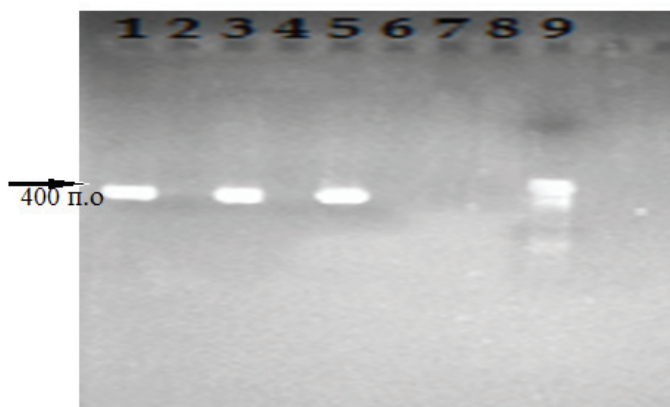


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР з ДНК штамів *Bacillus sp.* П90-1, П90-4 та П90-9:

1, 3, 5 – з парою праймерів до групи *B. cereus*; 2, 4, 6 – з парою праймерів до *B. thuringiensis*; 7 – негативний контроль ПЛР; 9 – маркери молекулярної маси (pBR322/BsuRI – 587, 540, 502, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 104, 89, 80 п.о., Fermentas).

Fig. 3. Electroforegram of PCR products with DNA *Bacillus sp.* П90-1, П90-4 and П90-9 strains:

1, 3, 5 – with *B. cereus* group-specific primers; 2, 4, 6 – with *B. thuringiensis* species-specific primers; 7 –negative control PCR; 9 – MW marker (pBR322/BsuRI – 587, 540, 502, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 104, 89, 80 b.p., Fermentas).

За використання праймерів до виду *B. thuringiensis* не було отримано жодного продукту ампліфікації. Отже, проведений молекулярно-біологічний аналіз ПЛР показує належність досліджених штамів *Bacillus sp.* П90-1, П90-4 та П90-9 до виду *B. cereus*, чим підтверджує результати хемотаксономічного визначення систематичного положення виділених штамів мікроорганізмів за жирнокислотним фінгерпринтом.

Плазмідні профілі є цінним інструментом для характеристики будь-яких бактерій, у тому числі багатьох бактерій роду *Bacillus*. Плазмідні бактерії роду *Bacillus* можуть бути наявні у кількості від 1 до 17 на клітину і мати розмір від 3 до 200 т.п.о. [14, 19]. Вивчення плазмідотримання та характеру плазмідних профілів бацил, виділених з харчових продуктів, показало, що переважно штами видів *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* та *B. pumilus* утримують плазмідні різного розміру, які можна розділити на дві окремі групи: маленькі плазмідні розміром приблизно 2, 5 і 12 т.п.н. і мегаплазмідні розміром приблизно 200 т.п.о. Мегаплазмідні бацил можуть відповідати за наявність різноманітних додаткових властивостей, наприклад, за наявність антагоністичної активності, резистентності до антибіотиків, синтез токсинів [14].

У штамів *B. cereus* П90-4 та П90-9 виявлені однакові за розміром плазмідні (рис. 4, доріжки 6, 7). Розмір цих плазмід корелює з розміром маркерної плазмідної рСА 25::Tn 9 (доріжка 11) і становить за попередньою оцінкою 12 т.п.о.

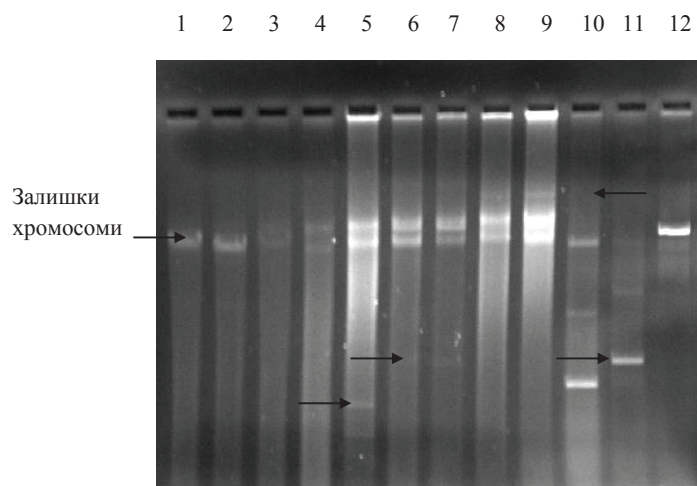


Рис. 4. Плазмідні профілі:

1 – *Bacillus subtilis* П90-3; 2 – *B. subtilis* ГС 2; 3 – *B. subtilis* ЯС- 1; 4 – *B. licheniformis* КП- 5; 5 – *B. pumilus* П90-7.; 6 – *B. cereus* П90-4, 7 – *B. cereus* П90-9; 8 – *L. sphaericus* П90-2; 9 – *L. sphaericus* П90-8; 10 – маркерна плазмідна рСА 25 (9,8 т.п.о.); 11 – маркерна плазмідна рСА 25::Tn 9 (12,5 т.п.о.), 12 – маркерна плазмідна РР4 (60 т.п.о.). Стрілками вказані позахромосомні ДНК.

Fig. 4. Plasmid profiles:

1 – *Bacillus subtilis* П90-3; 2 – *B. subtilis* ГС 2; 3 – *B. subtilis* ЯС- 1; 4 – *B. licheniformis* КП- 5; 5 – *B. pumilus* П90-7.; 6 – *B. cereus* П90-4, 7 – *B. cereus* П90-9; 8 – *Lysinibacillus sphaericus* П90-2; 9 – *L. sphaericus* П90-8; 10 – marker plasmid pCA 25 (9800 bp); 11 – marker plasmid pCA 25::Tn 9 (12500 bp), 12 – marker plasmid RP4 (60000 bp). Arrows indicate on extrachromosomal DNA.

У *L. sphaericus* П90-2 і П90-8 були виявлені однакові за розміром великі плазмідні або мегаплазмідні (доріжки 8 і 9), наявність яких властива для бактерій роду *Lysinibacillus* і підтверджує результати хемотаксономічного аналізу даних

штамів. Розмір цих плазмід значно перевищує розмір маркерної плазмиди RP4 (доріжка 12) та за попередньою оцінкою може становити близько 200 т.п.о. Найменші за розміром плазмиди виявлені у штаму *B. pumilus* П90-7. Їх розміри менші за розмір маркерної плазмиди рСА 25 і складають за попередньою оцінкою 2 і 5 т.п.о. (доріжки 5 і 10).

Таким чином, досліджені штами бактерій за хемотаксономічними властивостями належать до 4 родів порядку *Bacillales*: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* з переважанням представників першої рРНК групи та штамів виду *B. subtilis*. Результати жирнокислотного біомаркування штамів *Bacillus cereus* підтверджено методом ПЛР з групо- та видоспецифічними праймерами для зразків, які за даними хроматографії жирних кислот мали високі, але близькі значення індексів схожості за видами *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Вивчені плазмідні профілі бацил можуть слугувати цінним інструментом для диференціації специфічних штамів.

З використанням молекулярно-біологічних методів визначено характерні особливості та ідентифіковано штами термостійких аеробних і факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій – потенційних збудників харчових захворювань, псування і залишкової мікробіоти овочевої продукції півдня України.

А.В. Ямборко¹, А.Н. Остапчук¹, Ж.Ю. Сергеева¹,
Л.Н. Пилипенко², І.В. Пилипенко²

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: jamborko@mail.ru

²Одесская национальная академия пищевых технологий, ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина

ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПЛАЗМИДНЫЕ ПРОФИЛИ АЭРОБНЫХ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ ОВОЩНОЙ ПРОДУКЦИИ

Реферат

Цель. Установить систематическое положение и некоторые молекулярно-генетические особенности потенциальных возбудителей пищевых отравлений, порчи и остаточной микрофлоры овощных продуктов – аэробных и факультативно-анаэробных спорообразующих бактерий по их хемотаксономическим и плазмидным профилям. **Методы.** Анализ жирных кислот исследуемых штаммов проводили методом газовой хроматографии с использованием системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI, USA). Видовую принадлежность штаммов бацилл, которые по данным хроматографии жирных кислот имели высокие, но близкие значения индексов схожести между видами *Bacillus cereus* и *B. thuringiensis*, подтверждали проведением полимеразной цепной реакции с групо- и видоспецифическими праймерами. Выделение плазмидной ДНК проводили модифицированным методом Дженсена. **Результаты.** Анализ результатов



хроматографических исследований показал, что содержание разветвленных жирных кислот у исследованных штаммов составило от 54 до 85 % общего жирнокислотного пула клеток, включая ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты, а также их разветвленные структурные изомеры с преобладанием $\text{iso-C}_{15}:0$ и $\text{anteizo-C}_{15}:0$ жирных кислот. Также для них было характерно высокое содержание $\text{anteizo-C}_{17}:0$ и $\text{iso-C}_{17}:0$ жирных кислот. Преимущественно штаммы видов *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* и *B. pumilus* содержали плазмиды разного размера, которые относились к двум группам: небольшие плазмиды величиной от 2 до 12 т.п.о. и мегаплазмиды около 200 т.п.о. **Выводы.** Исследованные штаммы бактерий по хемотаксономическим свойствам принадлежали к 4 родам порядка *Bacillales*: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* с преобладанием представителей первой группы рРНК и доминированием штаммов вида *B. subtilis*. Результаты жирнокислотной биоиндикации штаммов *Bacillus cereus* подтверждены методом ПЦР с группно- и видоспецифическими праймерами для образцов, которые по результатам хроматографии жирных кислот имели высокие, но близкие значения индексов сходства по видам *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Отмеченные особенности жирнокислотного и плазмидного профилей исследованных микроорганизмов могут быть использованы как вспомогательный ключ для таксономического разграничения бациллярных контаминантов – потенциальных возбудителей пищевых заболеваний, порчи и остаточной микрофлоры овощной продукции юга Украины.

Ключевые слова: бациллярные контаминанты, состав жирных кислот, полимеразно-цепная реакция, идентификация, плазмидные профили.

G.V. Yamborko¹, A.M. Ostapchuk¹, Zh.Yu. Sergieieva¹,
L.M. Pylypenko², I.V. Pylypenko¹

¹Odesa I. I. Mechnykov National University, 2, Dvoryanska st., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: jamborko@mail.ru

²Odesa National Academy of Food Technologies, 112, Kanatna st., Odesa, 65039, Ukraine

CHEMOTAXONOMIC FEATURES AND PLASMID PROFILES OF AEROBIC AND FACULTATIVE ANAEROBIC SPORE-FORMING BACTERIA FROM VEGETABLES

Summary

Aim. To set the systematic position and some molecular genetic characteristics of potential agents of food poisoning and spoilage microorganisms residual vegetable products – aerobic and facultative anaerobic spore-forming bacteria in their hemotaxonomic and plasmid profiles. **Methods.** The fatty acid analysis of the investigated strains was carried out by gas chromatography using the system identification of microorganisms MIDI Sherlock (MIDI, USA). The species belonging of bacilli strains that according to chromatography of fatty acids had high, but close similarity indices by types of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis*, was confirmed by conducting PCR with specific primers. Plasmid DNA isolation was performed by the modified Jensen's method. **Results.** The analysis of the results of gas chromatography showed that content of branched fatty acids in the investigated strains was from 54 to 85% of the total fatty acid cell pool, including saturated and unsaturated fatty acids and their branched structural isomers with a predominance of $\text{iso-C}_{15}:0$ and $\text{anteizo-C}_{15}:0$ fatty acids. It was also characterized for them a high content of $\text{anteizo-C}_{17}:0$



and iso- $C_{17:0}$ fatty acids. Mostly strains of *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* and *B. pumilus* contained plasmids of different sizes, which fell into two groups: the small plasmids from 2000 to 12000 bp and megaplasmids to 200000 bp. **Conclusion.** The investigated strains of bacteria due their chemotaxonomic features have belonged to 4 genera of Bacillales order: *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* with the predominance of the first group of rRNA representatives and the dominance of *B. subtilis* strains. The results of the fatty acid biomarking of *Bacillus cereus* strains have been confirmed by PCR with the group- and species-specific primers for the samples that according to fatty acids chromatography had high but similar indices of similarity between *B. cereus* and *B. thuringiensis* species. The peculiarities of fatty acid and plasmid profiles of investigated microorganisms can be used as an auxiliary key for taxonomic differentiation of bacillary contaminants – potential pathogens of foodborne diseases, damage and residual microbiota of vegetable production in the South of Ukraine.

Key words: bacillary contaminants, fatty acid composition, polymerase chain reaction, identification, plasmid profiles.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Клив де В. Блэкберн. Микробиологическая порча пищевых продуктов / Пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.
2. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Шевелева С.А. и др. Микробиологические основы НАССР при производстве пищевых продуктов. – С.-Пб.: Проспект науки, 2007. – 350 с.
3. Scallan E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. -A., Roy, S. L. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens // *Emerg Infect Dis.* – 2011. – 17(1). – P. 7–15.
4. Connor N., Sikorski J., Rooney P. et al. Ecology of speciation of the genus *Bacillus* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – 76. – P. 1349–1358.
5. Джей Дж. М., Лёсснер Дж., Гольден Д. А. Современная пищевая микробиология. пер. 7-го англ. изд. — 2-е изд. (эл.). – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 886 с.
6. Biesta-Peters E.G., Dissel S., Reij M.W., Zwietering M. H., and Paul H. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market // *Journal of Food Protection* February. –2016. – V. 79. – № 2. – P. 230–238
7. Flores-Urbá K., Natividad-Bonifaci I., Vázquez-Quñone, C., Vázquez-Sali, C., Quiñones-Ramírez E. Detection of Toxigenic *Bacillus cereus* Strains Isolated from Vegetables in Mexico City // *Journal of Food Protection.* – 2014. – V. 77. – Issue 12. – P. 21–44.
8. Пилипенко Л.Н., Верхивкер Я.Г. , Пилипенко И.В. Консервирование пищевых продуктов. Микробиология, энергетика, контроль. – Одесса: «ВМВ», 2015. – 232 с.
9. de Carvalh C., Caramujo M.-J. Fatty Acids as a Tool to Understand Microbial Diversity and Their Role in Food Webs of Mediterranean Temporary Ponds // *Molecules.* – 2014. – V. 19. – P. 5570–5598.



10. Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Коротаєва Н.В., Волювач О.В., Гудзенко Т.В., Остапчук А.М. Склад жирних кислот ліпідів клітин штаму *Bacillus* sp. ОЗ-5, виділеного із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 4 (32). – С. 28–36.
11. Harley J.P., Prescott L.M. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth ed. – N.Y.: The McGraw Hill Companies, 2002. – 466 p.
12. Microbial ID Inc. Microbial identification system operational manual. Newark, Delaware: Microbial ID Inc., 1992.
13. Park S.H., Kim H.J., Kim J.H., Kim T.W., Kim H.Y. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR // J Microbial Biotechnol. – 2007. – 17 (7). – P. 1177–1182.
14. Jensen G.B. et al. The genetic basis of aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177. – P. 2914–2917.
15. Пилипенко І.В., Пауліна Я.Б., Пилипенко Л.М., Ямборко Г.В. Склад мікробних контамінантів овочевої сировини // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 3 (31). – С. 83–95.
16. Bergey's Manual of systematic bacteriology. The Proteobacteric. Part A. // Bergey's Manual Trust Department of Microbiology and Molecular Genetics Michigan State University. – 2005. – 2nd ed., Vol. 2. – P. 317–321.
17. Gilbert R., Turnbull P. C., Parry J. M., Kramer J. M. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: Their part in food poisoning and other clinical infections, in: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification // Academic Press. – London. – 1981. – P. 207–314.
18. Ash C., Farro, J.A.E., Wallbanks S. & Collins M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences // Letters in Applied Microbiology. – 1991. – V. 13. – P. 202–206.
19. Сергєєва Ж.Ю., Іваниця В.О. Плазмідні профілі штамів бактерій-антагоністів роду *Bacillus* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1 (29). – С. 44–49.

REFERENCES

1. Cleave B. Blackburn. Microbiological spoilage of food products. St. Petersburg: Profession, 2008; 784 p.
2. Galynkin VA, Zaikina NA, Sheveleva SA. Microbiological bases of HACCP in food production. St. Petersburg: Prospect of science, 2007; 350 p.
3. Scallan E, Hoekstra, RM., Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy, SL et al. Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011; 17(1): P. 7–15.
4. Connor N, Sikorski J, Rooney P et al. Ecology of speciation of the genus *Bacillus*. Appl. Environ. Microbiol. 2010; (76): 1349–1358.
5. Jay JM, Loessner J, Golden DA. Modern Food Microbiology. Moscow: Binom, 2014; 886 p.



6. Biesta-Peters EG, Dissel S, Reij MW, Zwietering MH, Paul H. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market. *Journal of Food Protection*. 2016; 79 (2): 230-238.
7. Flores-Urbá K, Natividad-Bonifaci I, Vázquez-Quinone C, Vázquez-Sali C, Quiñones-Ramírez E. Detection of Toxigenic *Bacillus cereus* Strains Isolated from Vegetables in Mexico City. *Journal of Food Protection*. 2014; 77(12): 21-44.
8. Pylypenko LN, Verchiver Y G, Pylypenko IV. Preservation of food products. *Microbiology, energy, control*. Odessa: BMV, 2015; 232 p.
9. de Carvalh C, Caramujo M. Fatty Acids as a Tool to Understand Microbial Diversity and Their Role in Food Webs of Mediterranean Temporary Ponds. *Molecules*. 2014; (19): 5570–5598.
10. Ivanytsia VO, Gorshkova OG, Korotaeva NV, Voliuvach OV, Gudzenko TV, Ostapchuk AM. Fatty acid composition of lipids of strain *Bacillus* sp. O3-5 isolated from oilcontaminated soil of the Zmiiny Island. *Microbiology & Biotechnology*. 2015; 4(32): 28-36.
11. Harley JP, Prescott LM. *Laboratory Exercises in Microbiology*, N.Y.:The McGraw Hill Companies. 2002; 466 p.
12. Microbial ID Inc. *Microbial identification system operational manual*. Newark, Delaware: Microbial ID Inc. 1992.
13. Park SH, Kim HJ, Kim JH, Kim TW, Kim HY. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *J. Microbial Biotechnol*. 2007; 17 (7):1177 – 1182.
14. Jensen GB et al. The genetic basis of aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid. *J. Bacteriol*. 1995; (177): 2914–2917.
15. Pylypenko IV, Paulina YB, Pylypenko LN, Yamborko GV. Composition of microbial contaminants of vegetable raw material. *Microbiology & Biotechnology*. 2015; 3(31): 83-95.
16. Bergey's Manual of systematic bacteriology. The Proteobacteric. Part A. In: Bergey's Manual Trust Department of Microbiology and Molecular Genetics. Michigan State University. 2005; 317-321.
17. Gilbert R, Turnbull PC, Parry JM, Kramer JM. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species: Their part in food poisoning and other clinical infections, in: *The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification*. Academic Press. 1981; 207 – 314.
18. Ash C, Farro, JE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*. 1991; (13): 202–206.
19. Sergieieva Zh, Ivanytsia V. Plasmid profiles of *Bacillus* genus antagonistic strain. *Microbiology & Biotechnology*. 2015; 1(29): 44-49.

Стаття надійшла до редакції 11.01.2017 р.

