

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ
ИДЕНТИФИКАЦИИ *VACILLUS CEREBUS***

**Феоктистова Е.А., студентка 2 курса экономического факультета
Чекалин А.М., студент 4 курса экономического факультета
Научный руководитель – Маллямова Э.Н., к.п.н., доцент
ФГБОУ Ульяновский ГАУ**

Ключевые слова: Bacillus cereus, бактерии, полимеразно-цепная реакция, праймеры, токсины, продукты питания

Работа посвящена описанию молекулярных методов, используемых для идентификации бактерий Bacillus cereus, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые обеспечивают множество преимуществ по сравнению с традиционными методами.

Молекулярные методы, используемые для идентификации бактерий *Bacillus cereus*, обеспечивают множество преимуществ по сравнению с традиционными методами, таких как универсальность, более низкое потребление времени и ресурсов, а также высокая специфичность. В последние десятилетия для обнаружения *B. cereus* были разработаны различные методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1]. Стадия амплификации связана с различными процедурами электрофореза, такими как электрофорез геля импульсного поля (PFGE), электрофорез геля с временным градиентом температуры (TTGE) и электрофорез денатурирующего градиентного геля (DGGE). Для получения профилей различных штаммов *B. cereus* были применены полимеразная цепная реакция на основе последовательности M13 (M13-PCR) и амплификация ДНК для получения профилей различных штаммов *B. cereus* [2]. Полученные в результате дискриминирующие и информативные профили позволили проследить распространение загрязнения *B. cereus* в пищевых продуктах. Исследователи смогли охарактеризовать микробиологическую опасность продуктов, предоставляемых торговыми автоматами с применением ПЦР. Используя специфические праймеры, нацеленные на ген *gyrB*, кодирующий

субъединицу ДНК-гиразы *B*, они выяснили, что почти 90% бактерий, выделенных из порошка горячего шоколада и горячих шоколадных напитков торгового автомата, принадлежали к группе *B. cereus* [3]. На протяжении многих лет были разработаны новые методы с ведущим принципом для обнаружения и отличия *B. cereus* от других членов группы *Bacillus* с помощью экономии времени и анализа in-situ. Например, авторы сравнили различные молекулярные методы, которые используют специфические зонды и праймеры в качестве элементов распознавания, чтобы отличить *B. cereus* от *B. thuringiensis* различного происхождения (пищевого, клинического и биопестицида). Они использовали три различные стратегии: метод ПЦР-ТТГЭ, нацеленный на ген *gyrB*, реп-ПЦР, в котором были нацелены две конкретные последовательности ДНК, и RAPD-ПЦР использует праймеры M13. Они продемонстрировали, что только гер-PCR может группировать штаммы одного и того же происхождения. Эта работа подчеркивает трудность дифференциации *B. cereus* и *B. thuringiensis* даже с помощью молекулярных методов [4]. Другим методом, используемым для отличия *B. cereus* от других членов группы *B. cereus*, является генотипирование с использованием анализа плавления с высоким разрешением. Этот анализ позволяет различать *B. cereus* путем типирования усиленной полиморфной межгенной области спейсера 16S-23S. Этот метод был предложен для контроля безопасности пищевых продуктов после адекватной санитарной обработки. Тем не менее, метод не может отделить *B. cereus* от *B. thuringiensis* [5]. Недавно инновационный подход к увеличению скорости пост-ПЦР-стадии был предложен исследователями. Они заменили обнаружение продуктов ПЦР с использованием трудоемкого электрофоретического метода системой быстрой визуализации с использованием наночастиц золота (AuNPs). Они также применяли моноазид пропидия (РМА) перед выполнением асимметричной амплификации ПЦР (asPCR), чтобы обнаружить только жизнеспособные клетки *B. cereus*. РМА представляет собой жизнеспособно-фотореактивный ДНК-связывающий краситель, который может проникать внутрь клетки при изменении проницаемости мембраны. Таким образом, он может связываться только с ДНК мертвых клеток. РМА, при связывании, постоянно модифицирует ДНК, которая, как следствие, не может быть амплифицирована на этапе asPCR. Ген, кодирующий цереулидсинтетазу (*cesB*),

использовался в качестве специфического биомаркера *B. cereus*, нацеленного во время ASPCR. Продукты ПЦР смешивали с AuNP и полученную окраску использовали в качестве индикатора присутствия *B. cereus*. Действительно, при добавлении соли и при отсутствии ампликонов AuNPs агрегируется и образует фиолетовый осадок. Напротив, добавление соли не вызывает агрегации AuNP в присутствии ампликонов, и раствор остается красным. Используя этот протокол, LOD $9,2 \times 10^1$ КОЕ/мл в PBS и $3,4 \times 10^2$ КОЕ/мл в молоке были получены соответственно. Помимо демонстрации осуществимости испытания, это исследование указало на важнейшие параметры, необходимые для получения низкого LOD, такие как концентрация соли, которая индуцирует агрегацию AuNPs, и длина праймеров [6].

Библиографический список:

1. Isolation and identification of chromium reducing *Bacillus cereus* species from chromium-contaminated soil for the biological detoxification of chromium / M.-H. Li, X.-Y. Gao, C. Li. et al. // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2020. – Т. 17. – №. 6. – С. 2118.
- 2 Wei J. et al. Novel strategy for rapidly and safely distinguishing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by use of peptide mass fingerprints based on matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry / J. Wei, H. Zhang, H. Zhang et al. //Journal of Clinical Microbiology. – 2020. – Т. 59. – №. 1. – С. e02358-20.
- 3 Advanced methods for detection of *Bacillus cereus* and its pathogenic factors / N. Ramarao, M. Marin, S.-L. Tran et al. // Sensors. – 2020. – Т. 20. – №. 9. – С. 2667.
- 4 Intraclade variability in toxin production and cytotoxicity of *Bacillus cereus* group type strains and dairy-associated isolates / R.A. Miller, J. Jian, S.M. Beno et al. // Applied and environmental microbiology. – 2018. – Т. 84. – №. 6. – С. e02479-17.
- 5 Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from raw milk and cattle farm environments / P. Fei, X. Yuan, S. Zhao et al. //Current Microbiology. – 2019. – Т. 76. – №. 11. – С. 1355-1360.
- 6 Isolation, identification, prevalence, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group bacteria from different foodstuffs in Tunisia / M. G.-B. Amor, M. Siala, M. Zayani et al. // Frontiers in microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 447.

**MOLECULAR METHODS USED TO IDENTIFY BACILLUS
CEREUS**

Feoktistova E.A., Chekalin AM,

Keywords: *Bacillus cereus, bacteria, polymerase-chain reaction, primers, toxins, food*

The work is devoted to the description of molecular methods used to identify Bacillus cereus bacteria based on polymerase chain reaction (PCR), which provide many advantages over conventional methods.