

## МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ, КЛАССИФИКАЦИИ И НУМЕРАЦИИ ПАТОГЕНОВ И ИХ ТОКСИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

*Рузиева Комила Эрназаровна*

*доц., Бухарский инженерно-технологический институт,  
Республика Узбекистан, г. Бухара*

*Мухамадиев Баходир Темирович*

*доц., Бухарский инженерно-технологический институт,  
Республика Узбекистан, г. Бухара  
E-mail: [jabbor.jumayev@mail.ru](mailto:jabbor.jumayev@mail.ru)*

## A METHOD FOR THE DETECTION, CLASSIFICATION AND NUMBERING OF PATHOGENS AND THEIR TOXINS IN FOOD

*Komila Ruzieva*

*associate professor,  
Bukhara Engineering Technological Institute,  
Republic of Uzbekistan, Bukhara*

*Bakhodir Mukhamadiev*

*associate professor,  
Bukhara Engineering Technological Institute,  
Republic of Uzbekistan, Bukhara*

### АННОТАЦИЯ

Статья посвящена рассмотрению методов обнаружения, классификации и нумерации патогенов и их токсинов в пищевых продуктах (Case study), которая применяется для укрепления теоретических знаний, применения их на практике. В качестве примера взяты методы анализа патогенных микробов, которые влияют на безопасность пищевых продуктов.

### ABSTRACT

The article is devoted to the consideration of methods for the detection, classification and numbering of pathogens and their toxins in food (Case study), which is used to strengthen theoretical knowledge and their application in practice. Methods for the analysis of pathogenic microbes that affect food safety are taken as an example.

**Ключевые слова:** токсины, патогены, ситуационный анализ, биопроба, культура клеток.

**Keywords:** toxins, pathogens, situational analysis, bioassay, cell culture.

### Введение

Для ситуационного анализа с целью обнаружения, классификации и нумерации патогенных бактерий и их токсинов можно использовать биопробы и ряд других подходов. Биопробы являются сравнительно новым методом определения безопасности пищевых продуктов (ПП) и окружающей среды. Общая тенденция заключается в проведении нескольких тестов на животных и там, где это возможно заменять их точными и воспроизводимыми аналитическими измерениями. Это однако не дает никакой информации о биологической активности обнаруженного аналита. Биопробы из животных поэтому заменяются все больше и больше *invitro* моделями, использующими животные и прокариотические клетки [1, 2]. Поэтому важно знать методологический подход для решения возникающих проблем, что и является целью данного исследования.

### Результаты и их обсуждение

I. Обнаружение токсина *Bac.cereus* (cerulide) в твердых пищевых продуктах, применяя биопробы с живыми подвижными семями быка, культуру клеток, а также HPLC-MS-жидкостная хроматография высокой разрешающей способности + масспектроскопия [1].

а) Биопроба. Биопробы, такие как образцы суб-организменных биологических тестов, где нельзя использовать целый организм, а только некоторые функциональные элементы организма. В таком тесте применяется семя быка (коммерчески производимые семя используются для оплодотворения *invitro*-концентрацией 5 млн.кл/мл. В ходе измерений прослеживается общая живучесть семени, так и развивающаяся их подвижность - визуальное наблюдение движения спермиев в пространстве, в то время как прогрессирующая подвижность описывает движения,

которые характеризуются определенными значениями подвижности: средняя скорость движения (CCD), скорость прямолинейного движения (СПД) и скорость криволинейного движения (СКД). Все эти параметры измеряют, используя анализатор спермиев + компьютер.

В тесте используется биологический эффект церулидана митохондрию и, через компьютер, измеряет изменение подвижности спермиев быка в качестве показателя влияния токсина. Он может дать качественную и полуколичественную информацию о наличии токсина.

б) Специфика использования и оборудование.

1. Двухкамерные слайды Leja (один слайд дает возможность для двух анализов).

2. HamiltonThorneCEROS, использующий адекватно жесткую упаковку.

Практические процедуры.

1. Экстракция: 50 г образца помещается в стеклянную чашку и упаривается досуха.

а) После добавления этанола к высушенной массе, дается проба ПП, инкубируется при комнатной температуре 1чг на горизонтальной качалке, а затем кипятится 15 мин при 100°C.

б) Этанольная фаза переносится в стеклянную чашку и упаривается досуха. Остаток растворяется в соответствующем объеме (1:5 мл) метанола или этанола.

в) Положительный или отрицательный контроль должен вытекать из того же типа ПП (или даже того ПП), инокулированного с церулид образующего или

не образующих штаммов. Экстранегативный контроль должен быть усилен для того, чтобы быть уверенным, что внутренние факторы ПП не взаимодействуют с подвижные спермиями.

2. Процедура тестирования:

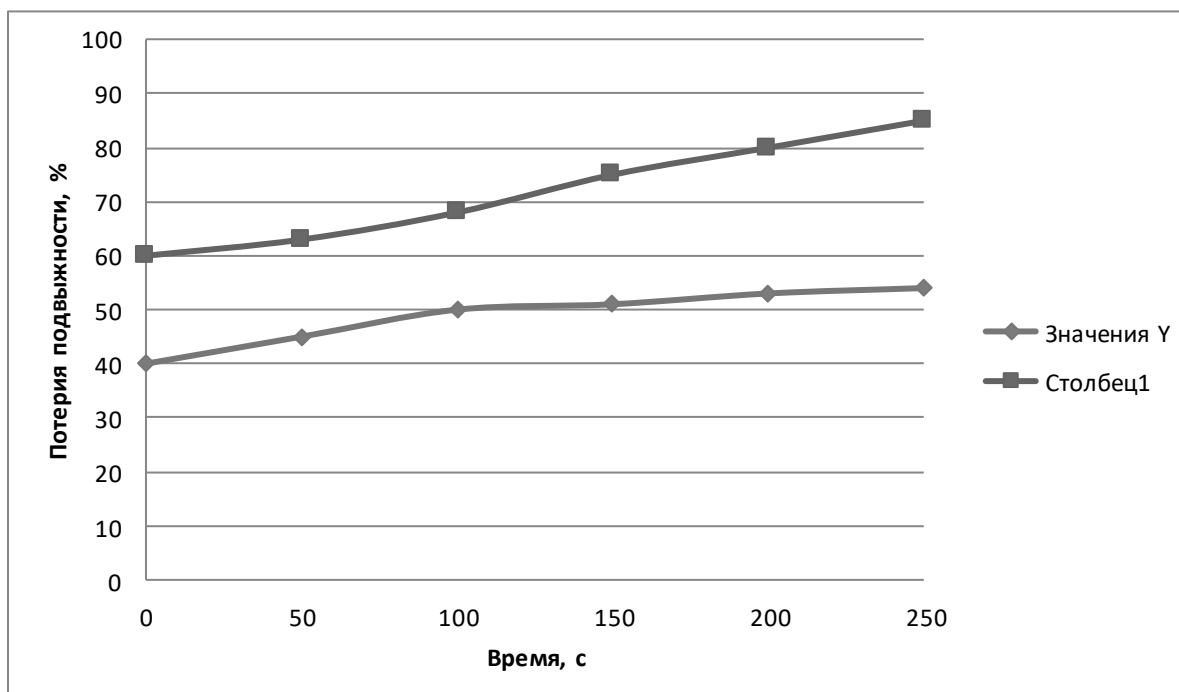
а) Спермии подвижны при 37°C и поэтому такую температуру следует поддерживать при микроскопическом обследовании.

б) Спермии и образец следует примешивать в соотношении 40:1 и смесь быстро инъецируется на слайд Leja.

в) затем следят за поведением общей и прогрессивной подвижности.

3. Обработка данных (отчет и выводы). Следует рассчитать интегральное изменение подвижности со временем, эти значения следует сравнивать с положительным контролем и стандартной кривой. Это дает полуколичественное расчётное значение наличия токсина.

Только для количественных наблюдений нет необходимости для какого-либо расчета, а только наблюдение того, что прогрессивная подвижность возрастает на более, чем 20-30 % от негативного контроля после 5 мин мониторинга. Если прогрессивная подвижность останется внутри 20 % вариации того, что негативное, мы можем заключить, что образец был негативным с лимитом тестового наблюдения (20 нг церулида на 1 г образца). Пример обработки данных, где изменение прогрессивной подвижности откладывается против времени, необходимой для изменение показан на рис. 1.



*V. cereus* столбец 1 – 5964, значения y - 5969

**Рисунок 1. Расчет потери подвижности спермиев после экспозиции к экстрактами изолятов**

#### 4. Культура клеток.

а) процедура экстракции можно будет проводить тем же способом, что и для биопроб.

б) упрощенная процедура тестирования 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетраазолиум бромид (МТТ) является синим, водорастворимой солью тетраазолиума, которая превращается в нерастворимый перпурный формазаза метаболизирующими клетками. Оказалось, что токсин подавляет функцию митохондрий и, что касается МТТ, как индикатор живучести клеток, а поэтому цитотоксиген, считается, что токсин мог подавлять конверсию МТТ.

- серия разбавлений чистого экстракта картофеля должна смешиваться с трипсинизированными Нер-2 (lareangelcarcinoma) при  $10^6$ /мл и смесь в микротитре инкубируется 40 ч при  $37^\circ\text{C}$  в 5 %  $\text{CO}_2$ .

- после удаления среды применяется МТТ и тубик инкубируется при  $37^\circ\text{C}$  3 ч.

- внутриклеточный формазаза солубилизируется с диметилсульфоксидом.

- запись абсорбции при 570 нм с ридером тубика микротитра.

- конечное значение титра следует регистрировать в качестве реципрокного сильного разбавления, дающей колориметрическое измерение меньше, чем-то, что дает негативный контроль.

#### 5. Химические пробы (HPLC-MS)

а) процедура экстракции может быть такой же, что и для биопроб.

б) осуществление процедуры упрощенного тестирования [2,3].

- используются стандартные тесты, т.е. валиномицин (полученный коммерчески) и церулид, очищенный от *V. cereus*, оба растворяются в метаноле.

- применяется С8 колонка (100 по 2,1 мм размер частиц 5  $\mu\text{m}$ ).

- растворитель: смесь 95 % ацетонитрила, 4,9 %  $\text{H}_2\text{O}$  и 0,1 % трифторуксусной кислоты, скорости потока 0,15 мл/мин, объем вносимого образца 1,0  $\mu\text{l}$ .

- А210мониторится с DAD (DiodeArray Detector).

- после хроматографического разделения, образец вносится ЕИМА (electron Spray ion trapmassanalyser). Следует накапливать массы от 500 до 1300  $\text{m/z}$ .

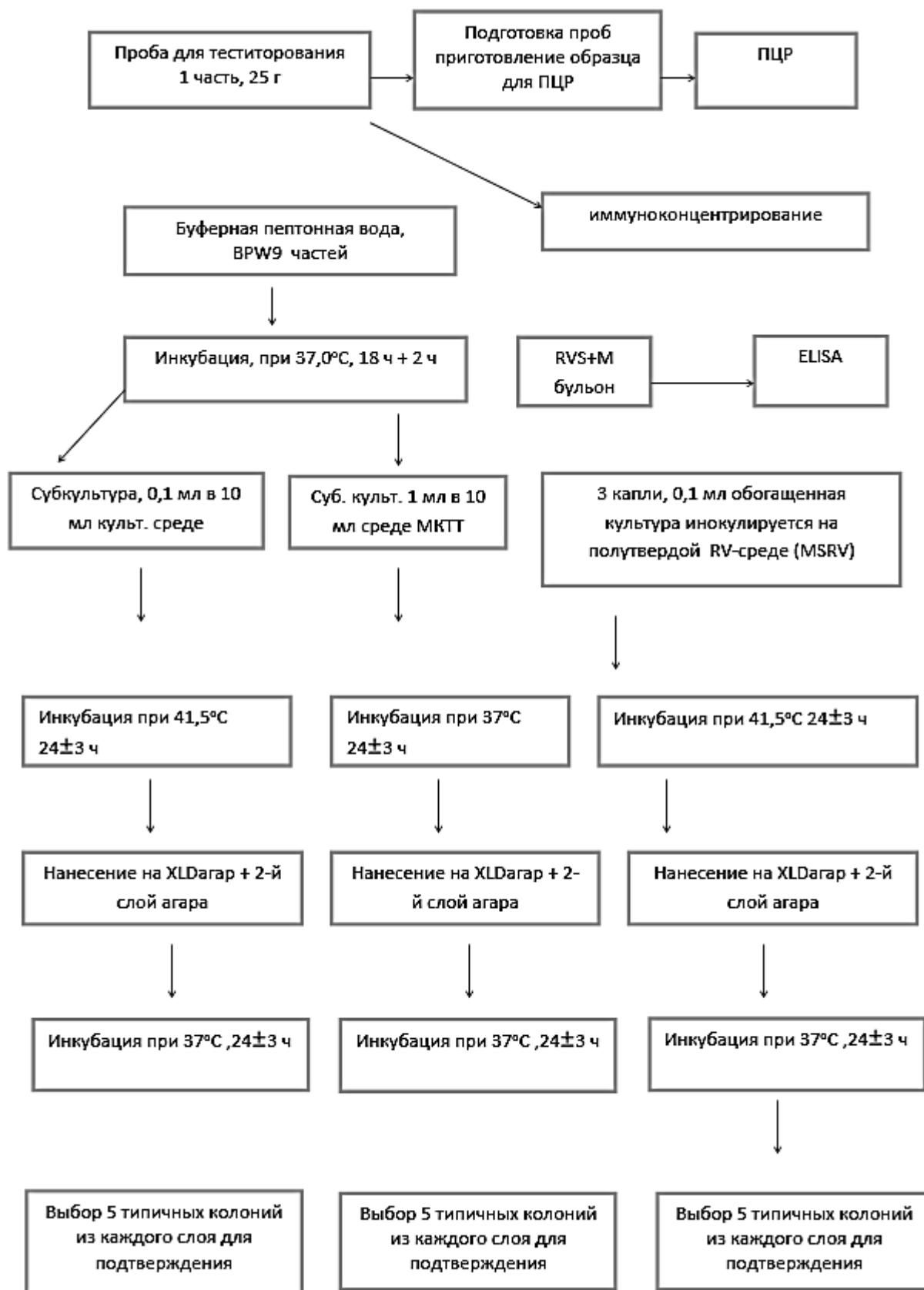
- для обнаружения и квантификации низких концентраций ( $< 100$  нг на инъекцию) близких к лимиту детекции, простые ионы 1129 и 1171 ( $\text{NH}_4^+$ аддукты) были мониторированы для валиномицина и церулида, соответственно [4].

II. Детекция *Salmonella* spp в ПП, животных кормах и добавок.

В настоящее время доступно много реальной информации по методам выделения и детекции *Salm.*, чем для любого другого патогена. Это и тот факт, что хорошо установлена пищевая патогенность сальмонеллы по природе ведет к стандартизованным методам для её детекции. Однако, применяются не только стандартные методы, но также и новые быстрые методы, значительно укорачивающие анализы, нашли свое применение в современной пищевой микробиологии [5].

В таблице.1 приведен упрощенный обзор некоторых существующих методов детекции с указанием стандартных методов, как потребляющих много времени и методов, основанных на ПЦР в качестве экспресс метода. Во всех сценариях приведенных примеров образцы вначале инкубируются в неселективной первично обогащенной (пере обогащенной) среде. Эта стадия дает возможность для возбуждения спящих клеток сальмонеллы. Отсюда следует различие между распространенными методами, как это подчеркнуто в таблице [6, 7, 8].

Таблица 1.



-Приготовление образца для ПЦР:

1 мл обогащенного образца центрифугируется при 1000 об/мин.

Затем отделенный супернатантный слой реагента добавляется в релети она далее инкубируется при 100°C 15 мин.

Из горячего образца, который приготовлен и центрифугирован, супернатант затем используется для ПЦР анализа.

Заключение. Таким образом, ситуационный анализ по детекции и квантификации патогенов и их токсинов можно осуществлять либо с помощью биопроб, либо тонкослойной хроматографией в сочетании с масспектральным анализом.

#### Список литературы:

1. Haggblom M.M. et al. "Quantitative analysis of cereulide, the emeti toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions", 2012, 94, 1141.
2. De Boez E. et, al. "Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms", *Jnt.J.Food Microbiol.*, 2009, 521, 1149.
3. Anon, ISO 6573 : 2002. "Microbiology of food and animal feeding stuffer – Horizontal method for detection of salmonella spp." Geneva: International organization for standartization, 2002.
4. Н.А.Касимова, Л.Р.Джураева «Биопробы в анализе химических опасностей в пищевых продуктах», В сб. матер.межд.конф., Краснодар, октябрь 2020.
5. З.М.Бердиева, Б.Т.Мухамадиев «Микробиологический анализ пищевых продуктов». «Педагог. Мастерство» изд. БГУ, 2020 № 5 с. 139.
6. Б.Г.Рамазонов, Н.А.Касимова «Пищевые вирусы и вызываемые ими заболевания» В сб. матер.межд.конф., Бухара ноябрь 2020.