



Научная статья

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ХАРАКТЕРИСТИКА *BACILLUS LICHENIFORMIS* И *BACILLUS SUBTILIS* В ПРОДУКТАХ ИЗ МУКИ ЯМСА ВО ВЬЕТНАМЕ КАК ФАКТОРА РИСКА ЗДОРОВЬЮ

Као Конг Кханг¹, Нгуен Тхи Кью Анх², Пхам Нгок Ха¹, Нгуен Тханг Трунг¹, Тран Хонг Ба¹, Ле Тхи Хонг Хао¹

¹Национальный институт по контролю качества пищевых продуктов, Вьетнам, г. Ханой, ул. Пхам Тхан Дуат, 65

²Фармацевтический университет Ханоя, Вьетнам, г. Ханой, ул. Ле Тханг Тонг, 15

Ямс (*Dioscorea alata* L.) – это богатый питательными веществами корнеплод, широко употребляемый в пищу в тропических регионах. Во Вьетнаме большой популярностью пользуются как свежий ямс, так и продукты из муки ямса, но данные об их микробиологической безопасности ограничены.

Целью данного исследования было изучение распространенности и характеристика *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis* в муке из ямса, продающейся на рынке Вьетнама. Микробиологический анализ выявил различные уровни аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов в образцах; преобладающим видом были *B. licheniformis*. Такие бактерии, как *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, и *Salmonella* spp., не были обнаружены ни в одном из образцов. Следует отметить, что все штаммы *B. licheniformis* являлись носителями генного кластера амоксициллин + клавулановая кислота, эритромицин и цефалоспорины. И, наоборот, штаммы *B. subtilis* показали отрицательный результат в тестах на основные гены энтеротоксина (*nhe*, *hbl*, *cytK*). Результаты данного исследования говорят о наличии потенциальных рисков здоровью, связанных с употреблением продуктов из муки ямса, и о необходимости целенаправленного гигиенического контроля и обновления микробиологических стандартов.

Ключевые слова: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, ямс, устойчивость к антибиотикам, M45 CLSI, *bceT*, *cytK*, *hbl*, *nhe*, *licABC*.

Ямс (*Dioscorea alata* L.), также известный во Вьетнаме как *khoai vạc*, *củ mễ* или *củ sái* принадлежит к роду *Dioscorea* семейства *Dioscoreaceae*. Это однодольная культура, выращиваемая, прежде всего, в таких регионах, как Африка, США, Южно-Тихоокеанский регион и Азия. Она является основной частью рациона населения многих тропических

стран [1]. Существует две основные разновидности ямса в зависимости от цвета мякоти: белый и пурпурный ямс. Клубни ямса богаты углеводами, в особенности крахмалом, что делает их важным источником энергии в рационе [2]. Согласно данным Международного института тропического сельского хозяйства (ИТА), в Западной Африке выращивается

© Као Конг Кханг, Нгуен Тхи Кью Анх, Пхам Нгок Ха, Нгуен Тханг Трунг, Тран Хонг Ба, Ле Тхи Хонг Хао, 2025
Као Конг Кханг – руководитель отдела исследований и разработок (e-mail: khanhcc@nifc.gov.vn; тел.: +84 943 850 316; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-9001-9462>).

Нгуен Тхи Кью Анх – преподаватель (e-mail: nhnguyenkieu@gmail.com; тел.: +84 915 158 462; ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-1127-0729>).

Пхам Нгок Ха – научный сотрудник лаборатории пищевой микробиологии и генетически модифицированных продуктов питания (e-mail: hapn0411@gmail.com; тел.: +84 963 991 575; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-1248-3404>).

Нгуен Тханг Трунг – руководитель лаборатории пищевой микробиологии и генетически модифицированных продуктов питания (e-mail: trungnt@nifc.gov.vn; тел.: +84 349 363 269; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8732-9911>).

Тран Хонг Ба – научный сотрудник лаборатории пищевой микробиологии и генетически модифицированных продуктов питания (e-mail: ba.pt070488@gmail.com; тел.: +84 984 316 925).

Ле Тхи Хонг Хао – директор (e-mail: lethihonghao@yahoo.com; тел.: +84 904 248 167; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3570-8570>).

94 % мирового урожая ямса, где только Нигерии принадлежит 71 % всего объема ямса, выращенного в 2021 г.¹ Во Вьетнаме ямс выращивается во всех семи агроэкологических зонах. Среди выращиваемых во Вьетнаме разновидностей ямса две самые урожайные включают белый ямс (41,4 тонны на гектар (т/га)) и пурпурный ямс (32,5 т/га)². Производство муки из ямса, как правило, включает в себя такие стадии, как сбор урожая, мойка, нарезка, перемалывание, прессовка, сушка, просеивание и упаковка [3]. Риск микробного загрязнения возрастает во время сбора урожая и обработки на малых фермах или в домохозяйствах, где не соблюдаются адекватные гигиенические условия и условия хранения. Такие микроорганизмы, как аэробные бактерии, плесневые и дрожжевые грибы и кишечные бактерии, могут размножаться в процессе сушки и хранения. В особенности некоторые виды *Bacillus* могут формировать термоустойчивые споры, которые выживают в высушенных продуктах, создавая потенциальные риски, связанные с безопасностью продуктов питания.

Bacillus licheniformis (*B. licheniformis*) – это грамположительная палочкообразная аэробная бактерия, которая впервые была выделена из почвы в 1890 г. Она повсеместно встречается в почве, воде, воздухе и организмах разнообразных животных [4]. Этот вид известен своей способностью вырабатывать целый ряд полезных соединений, включая α -амилазу (продукт распада крахмала), β -галактосидазу (гидролиз лактозы), щелочные протеазы (продукт распада белка), антибиопленочные агенты и кератиназу (продукт распада кератина) [5]. Несмотря на широкое применение в промышленности, *B. licheniformis* могут также вызывать алиментарно-зависимые заболевания вследствие продукции лихеницина, липопептидного цитотоксина, структурно и функционально схожего с цереулидом, продуцируемым *B. cereus*. Генный кластер *licABC* (ранее известный как *lchAA*, *lchAB*, *lchAC*), который кодирует ферменты синтетазы лихеницина, обнаруживался в многочисленных штаммах *B. licheniformis*, выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды [6]. K.Y.C. Yeak et al. (2022) установили, что концентрация лихеницина, необходимая для подавления 50 % вариативности кишечных клеток Caco-2 в организме человека и органических клетках подвздошной кишки свиньи, составила 16,6 мкг/мл и 16,8 мкг/мл соответственно [6]. В 1999 г. M.S. Salkinoja-Salonen et al. сообщили о смертель-

ном случае, вызванном детским питанием, загрязненным *B. licheniformis*³.

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) – спорообразующая бактерия-пробиотик, повсеместно встречается в почве и ЖКТ определенных млекопитающих. Этот микроорганизм вносит определенный вклад в соблюдение благоприятного микробного баланса в пищеварительной системе. *B. subtilis* продуцирует внеклеточные матричные компоненты, которые обладают защитным действием и поддерживают рост и активность других полезных бактерий-пробиотиков [7]. Хотя в целом *B. subtilis* считается полезной бактерией, определенные штаммы могут являться носителями генов токсинов, гомологичных обнаруживаемым в *B. cereus*, например, *nhe*, *hbl*, и *cytK*, что подчеркивает необходимость тщательного вирусного скрининга в процессе оценки безопасности [8–10].

Целью данного исследования являлось: 1) изучить распространенности микробного загрязнения свежего ямса и муки из ямса, продающейся на рынке Вьетнама; 2) изолировать и идентифицировать штаммы *B. licheniformis* и *B. Subtilis*; 3) оценить профили их лекарственной устойчивости и 4) определить присутствие генов, кодирующих токсины.

Результаты данного исследования могут послужить ранним предупреждением и внести вклад в разработку стандартов микробиологической безопасности для производства и потребления продуктов на основе ямса во Вьетнаме.

Материалы и методы. Четыре образца свежих клубней пурпурного ямса, включая как белые, так и пурпурные разновидности, были приобретены непосредственно на полях, где выращивается ямс, в провинции Бак Ninh, Вьетнам. Далее семь образцов муки из сухого пурпурного ямса были закуплены в местных торговых точках в том же регионе. Все образцы были охлаждены перед транспортировкой, доставлены в Национальный институт по контролю качества пищевых продуктов в охлажденном состоянии и проанализированы в соответствующей лаборатории (NIFC).

Микробное загрязнение клубней пурпурного ямса и продуктов на основе ямса. Общие уровни аэробных бактерий, плесневых и дрожжевых грибов, кишечных бактерий, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) и *Salmonella* spp. были проанализированы количественно и качественно в соответствии с действующими во Вьетнаме национальными стандартами:

¹ Yam [Электронный ресурс] // International Institute of Tropical Agriculture (IITA). – URL: <https://www.iita.org/cropsnew/dioscoria/> (дата обращения: 12.08.2024).

² Kết quả đánh giá đa dạng nguồn gen cây khoai mỡ (*dioscorea alata* L.) đang bảo quản tại ngân hàng gen cây trồng quốc gia năm 2009 [Электронный ресурс] // Trung Tâm Tài Nguyên Thực Vật [Plant Resources Center (PRC)]. – URL: <https://prc.org.vn/?p=587> (дата обращения: 12.08.2024).

³ Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning / M.S. Salkinoja-Salonen, R. Vuorio, M.A. Andersson, P. Kämpfer, M.C. Andersson, T. Honkanen-Buzalski, A.C. Scoging // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65, № 10. – P. 4637–4645. DOI: 10.1128/AEM.65.10.4637-4645.1999

- Определение общего содержания аэробных организмов в продуктах питания: TCVN 11039-1: 2015;
- Определение плесневых и дрожжевых грибов в продуктах питания: TCVN 8275-2: 2010;
- Определение кишечных бактерий: TCVN 6848: 2007;
- Определение *Escherichia coli*: TCVN 7924-2: 2008;
- Обнаружение *Salmonella spp.*: TCVN 10780-1,2: 2017;
- Определение предполагаемого наличия *Bacillus cereus*: TCVN 4992: 2005.

Изоляция и идентификация *B. licheniformis* и *B. subtilis* в продуктах из мяса. 10 г каждого образца продукта питания были гомогенизированы в 90 мл пептонной воды (Merck). Серия растворов до 10^{-5} была приготовлена для каждого образца, и 100 мкл каждого раствора были инокулированы на маннитол-агаре с добавлением яичного желтка и полимиксина (МYP; Merck). Инкубация во всех чашках продолжалась в течение одной ночи при температуре 37 °C. Колонии с типичными морфологическими признаками – желтого цвета, слизеподобные или вулканические в виде тонких полосок были помещены на соевый агар Tryptone (TSA; Merck), инкубированы в течение 24 ч при 37 °C, а затем идентифицированы с применением метода матрично-активированной лазерной десорбции / ионизации – время пролетной детекции MALDI-TOF на приборе VITEK® MS (BioMérieux SA, Marcy l’Etoile, Франция). В качестве контрольного штамма применялся *E. coli* ATCC 8739.

Полная ДНК *B. licheniformis* и *B. subtilis* была выделена согласно протоколу для грамположительных бактерий при помощи набора для очистки ДНК GeneJET Genomic DNA Purification kit (ThermoFisher; C5042). Общая концентрация ДНК-штаммов *B. cereus* была определена при помощи наноспектрофотометра при 260 нм. Для подтверждения присутствия *B. licheniformis* среди штаммов, выделенных из образцов муки из пурпурного мяса, в ПЦР тестах были использованы четыре специфических маркера генов – *ligD*, *rfaB*, *BL00303* и *serA* [11]. В то же время наличие *B. subtilis* было верифициро-

вано с использованием маркера *aprE*, специфического для данного вида [12]. Пары праймеров, использованные для подтверждения наличия *B. licheniformis* и *B. subtilis*, приведены в табл. 1.

Оценка профиля лекарственной устойчивости *B. licheniformis* и *B. Subtilis*, обнаруженных в пищевых продуктах на основе мяса. Лекарственная устойчивость штаммов *B. licheniformis* и *B. subtilis* была оценена при помощи диско-диффузионного метода в тесте Кирби – Бауэра [11]. Образцы *B. licheniformis* и *B. subtilis* выращивались в 10 мл стерильного бульона с сердечно-мозговой вытяжкой до тех пор, пока плотность клеток не достигала 0,5 стандарта МакФарланда, что составляет примерно $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Для распределения бактериальной суспензии на агаре Muller – Hinton применялся стерильный мазок. Всего было протестировано девять типов антибиотиков согласно рекомендациям M45 CLSI, включая ампициллин (AMP, 10 мкг/диск), хлорамфеникол (C, 30 мкг/диск), ципрофлоксацин (CIP, 5 мкг/диск), эритромицин (ERY, 15 мкг/диск), имипенем (IPM, 10 мкг/диск), меропенем (MRP, 10 мкг/диск), тетрациклин (TE, 30 мкг/диск), ванкомицин (VAN, 30 мкг/диск) и гентамицин (CN, 10 мкг/диск). Помимо антибиотиков, указанных в рекомендациях CLSI, с целью расширения профиля лекарственной устойчивости также были протестированы дополнительные антимикробные препараты, широко используемые в клинической практике и мониторинге безопасности пищевых продуктов. Они включали амоксициллин+клавулановую кислоту (AMC, 30 мкг/10 мкг/диск), азтреонам (ATM, 30 мкг/диск), цефотаксим (CTX, 30 мкг/диск), цефокситин (FOX, 30 мкг/диск), цефтазидим + клаксациллин (CAC), цефтриаксон (CRO, 30 мкг/диск), цефуроксим (CXM, 30 мкг/диск), метициллин (MET, 5 мкг/диск), налидиксовую кислоту (NA, 30 мкг/диск), офлоксацин (OFX, 5 мкг/диск), оксациллин (OX, 5 мкг/диск), пенициллин (PRL, 10 МЕ/диск), пиперациллин (PIP, 30 мкг/диск), полимиксин В (PB, 100 МЕ/диск), спектиномицин (SPC, 100 мкг/диск), стрептомицин (S, 10 мкг/диск), сульфаметоксазол (MX, 100 мкг/диск) и триметроприм (TM, 5 мкг/диск). Диски были размещены на поверхности агара при

Таблица 1

Специфические маркеры генов для подтверждения *B. licheniformis* и *B. subtilis*

Наименования	Последовательность (5'-3')	Ген	Размер (по)	Источник
BL00303-F	CGT ATC GGT CGT TCA CTC GG	BL00303	332	[11]
BL00303-R	GTT GAT TTT CCG TAG CCT GGG			
serA2F	GAC AAG AGA AAT TTC TAC GAG CAA GTA CAA T	serA2	247	
serA2R	GCA GCC TTC CAA TTA CTC CTT CTG CCA CAG T			
rfaBF	TAC GCT AAG GAG GGG C	rfaB	376	
rfaBR	GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT			
ligDF	CTA TCA GCA CTT ATG GCA G	ligD	216	
ligDR	ACT CCT AGC GGT GTT CC			
BsF	ACC ATT GCG GTA GGT GCG	aprE	581	[12]
BsR	GCG TTT GTC CAA GTC GGG			

помощи стерильных хирургических щипцов для последующей инкубации при температуре 37 °C в течение 18 ч⁴. Результаты тестов на лекарственную устойчивость были получены при помощи измерения диаметра зоны подавления, представленной четко видимой областью вокруг диска с антибиотиком.

Определение генов токсинов *B. licheniformis* и *B. subtilis* в продуктах из ямса. Метод экстракции ДНК. Выделенные штаммы были культивированы в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой (Brain Heart Infusion broth) и инкубированы в течение 18–24 ч при температуре 37 °C. Полная ДНК *B. licheniformis* и *B. subtilis* была выделена в соответствии с протоколом для грамположительных бактерий для набора очистки геномной ДНК GeneJET (Thermofisher; C5042). Общая концентрация ДНК штаммов *B. licheniformis* и *B. subtilis* была определена с применением наноспектрофотометра со спектральной поглощательной способностью 260 нм. До применения раствор ДНК хранился при температуре -20 °C.

ПЦР и мультиплексная ПЦР. Пары праймеров, использованных в рамках данного исследования для обнаружения генов токсинов штаммов *B. licheniformis* and *B. subtilis*, найденных в продуктах на основе ямса, приведены в табл. 2. Обнаружение генов токсинов в *B. licheniformis* было выполнено с использованием видоспецифических праймеров, нацеленных на *licA*, *licB* и *licC*, которые кодируют компоненты комплекса синтазы лихеницина [13]. Для оценки потенциальной патогенности *B. subtilis* был произведен скрининг штаммов на наличие генов диарейного токсина, который обычно

обнаруживается в штаммах *B. cereus*, включая генные кластеры *nhe*, *hbl* и *cytK* [14]. Простая ПЦР применялась для амплификации генов *licA*, *licB*, *licC* и *cytK*, в то время как для определения оставшихся генов энтеротоксинов *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD* была использована мультиплексная ПЦР.

Результаты и их обсуждение. Уровни микробного загрязнения в пурпурном ямсе и продуктах из него. Результаты анализа выявили значительно более высокие уровни загрязнения в обработанном продукте – муке из пурпурного ямса, по сравнению с клубнями ямса непосредственно после сбора на поле. Колиформные бактерии были обнаружены только в шелухе свежих клубней (до $2,1 \cdot 10^5$ КОЕ/г), но не в мякоти, в то время как только в одном образце муки был выявлен минимальный уровень таких бактерий ($2,9 \cdot 10^2$ КОЕ/г). Возможной причиной этого может быть загрязнение в процессе переработки (табл. 3 и 4).

Широко распространенные пищевые патогены (*B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp.) не были обнаружены ни в одном из образцов. Однако в образцах муки из ямса были обнаружены значительно повышенные уровни плесневых и дрожжевых грибов (от $3,8 \cdot 10^1$ до $5,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г), по сравнению с образцами ямса. Подобным образом аэробные бактерии присутствовали в избытке в муке (до $6,8 \cdot 10^6$ КОЕ/г), в то время как в образцах ямса были обнаружены значительно более низкие уровни (не выше $4,0 \cdot 10^1$ КОЕ/г) (см. табл. 3, 4). Следует отметить, что *B. licheniformis* был обнаружен только в 5 из 7 образцов муки, а *B. subtilis* был – в 2, но ни та,

Таблица 2

Пары праймеров, использованные для определения генов токсинов *B. licheniformis* и *B. subtilis*

Наименование	Последовательность (5'-3')	Ген	Размер (по)	Источник
nheAF	TAC GCT AAG GAG GGG C	nheA	499	[14]
nheAR	GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT			
nheBF	CTA TCA GCA CTT ATG GCA G	nheB	769	
nheBR	ACT CCT AGC GGT GTT CC			
nheCF	CGG TAG TGA TTG CTG GG	nheC	581	
nheCR	CAG CAT TCG TAC TTG CCA A			
hblAF	GTG CAG ATG TTG ATG CCG AT	hblA	1154	
hblAR	ATG CCA CTG CCT GGA CAT A			
HblCF	GAT ACT AAT GTG GCA ACT GC	hblC	740	
HblCR	TTG AGA CTG CTC GTT AGT TG			
HblDF	AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT	hblD	829	
HblDR	CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT			
cytKF	CGA CGT CAC AAG TTG TAA CA	cytK	565	
cytKR	CGT GTG TAA ATA CCC CAG TT			
LicAF	GTGCCTGATGTAACGAATG	licA	735	[13]
LicAR	CACTTCCTGCCATATACC			
LicB2F	TGATCAGCCGGCCGTTGTCT	licB	904	
LicB2R	GGCGAATTGTCCGATCATGTCC			
LicCF	GCCTATCTGCCGATTGAC	licC	1195	
LicCR	TATATGCATCCGGCACCA			

⁴ Biemer J.J. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method // Ann. Clin. Lab. Sci. (1971). – 1973. – Vol. 3, № 2. – P. 135–140.

Таблица 3

Уровни микробного загрязнения в пурпурном ямсе, собранном непосредственно на поле, КОЕ/г

№ п/п	Показатель	Шелуха белого ямса	Шелуха пурпурного ямса	Мякоть белого ямса	Мякоть пурпурного ямса
1	Колиформные бактерии	$2,1 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^3$	Н/О	Н/О
2	<i>B.cereus</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
3	<i>E.coli</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
4	<i>S.aureus</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
5	<i>Samonella</i> spp.	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
6	Плесневые и дрожжевые грибки	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	Н/О	$1 \cdot 10^1$
7	Аэробные микроорганизмы, всего	$6,1 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^1$	$7 \cdot 10^1$
8	<i>B. licheniformis</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
9	<i>B. subtilis</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О

Примечание: Н/О – не обнаружено.

Таблица 4

Уровни микробного загрязнения в муке из пурпурного ямса, приобретенной в местных торговых точках, КОЕ/г

№ п/п	Показатель	1	2	3	4	5	6	7
1	Колиформные бактерии	$2,9 \cdot 10^2$	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
2	<i>B.cereus</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
3	<i>E.coli</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
4	<i>S.aureus</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
5	<i>Samonella</i> spp.	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
6	Плесневые и дрожжевые грибки	$1,6 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^2$	$4,2 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^1$	$5,0 \cdot 10^2$
7	Аэробные микроорганизмы, всего	$3,8 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^5$
8	<i>B. licheniformis</i>	$2,1 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^2$	$9,1 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	Н/О	Н/О
9	<i>B. subtilis</i>	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	$3,0 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^1$

Примечание: Н/О – не обнаружено.

ни другая бактерия не были найдены в образцах свежего ямса. Это свидетельствует о том, что загрязнение, по-видимому, возникло в процессе переработки или хранения. Результаты анализа также подчеркивают наличие пробела в регулирующих процедурах оценки микробиологической безопасности: действующие в данное время микробиологические критерии (QCVN 8-3: 2012/BYT) не содержат специфических лимитов для корнеплодов, таких как ямс, что делает затруднительной оценку их безопасности или соответствия гигиеническим стандартам⁵. Это отсутствие четких стандартов представляет собой проблему для гигиенического контроля пищевых продуктов и защиты прав потребителей, в особенности, когда речь идет о традиционных продуктах, для которых не установлены безопасные уровни микробного загрязнения. Из всех проанализированных образцов муки из ямса для последующего анализа было выбрано 10 репрезентативных штаммов *B. licheniformis* и 7 репрезентативных штаммов *B. subtilis*.

Выделение и идентификация *B. licheniformis* и *B. subtilis* в продуктах на основе ямса. Идентификация методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Семнадцать колоний бактерий, выделенных из

муки ямса, были первоначально идентифицированы методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Все штаммы показали результат выше 2,0, что говорит о достоверности идентификации на видовом уровне. Десять из этих штаммов были идентифицированы как *B. Licheniformis*, а 7 – как *B. subtilis*. Предварительные результаты идентификации были подтверждены видовыми тестами ПЦР, ориентированными на определение уникальных маркеров генов *B. licheniformis* и *B. subtilis*, что обеспечивало точность анализа на уровне ДНК.

Подтверждение специфическими маркерами ДНК. Как показано на рис. 1, все 10 штаммов (столбцы 1–10) показали четкие различимые ампликоны, соответствующие ожидаемым размерам каждой пары праймеров: *ligD* (216 по), *rfaB* (376 по), *BL00303* (332 по) и *serA* (247 по), с единственным исключением: штамм номер 9 не дал продукт ПЦР, соответствующий гену *rfaB*.

Отсутствие амплификации в штамме 9 для гена *rfaB* с одновременным присутствием положительных сигналов для трех остальных генов говорит о возможной вариации последовательности на участке связывания праймеров или удалении гена *rfaB* в этом

⁵ Giới hạn ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm theo QCVN 8-3:2012/BYT [Электронный ресурс] // Thư Viện Pháp Luật. – URL: <https://thuvienphapluat.vn/chinh-sach-phap-luat-moi/vn/ho-tro-phap-luat/tu-van-phap-luat/58299/gioi-han-oi-nhiem-vi-sinh-vat-trong-thuc-pham-theo-qcvn-8-3-2012-byt> (дата обращения: 12.08.2024).

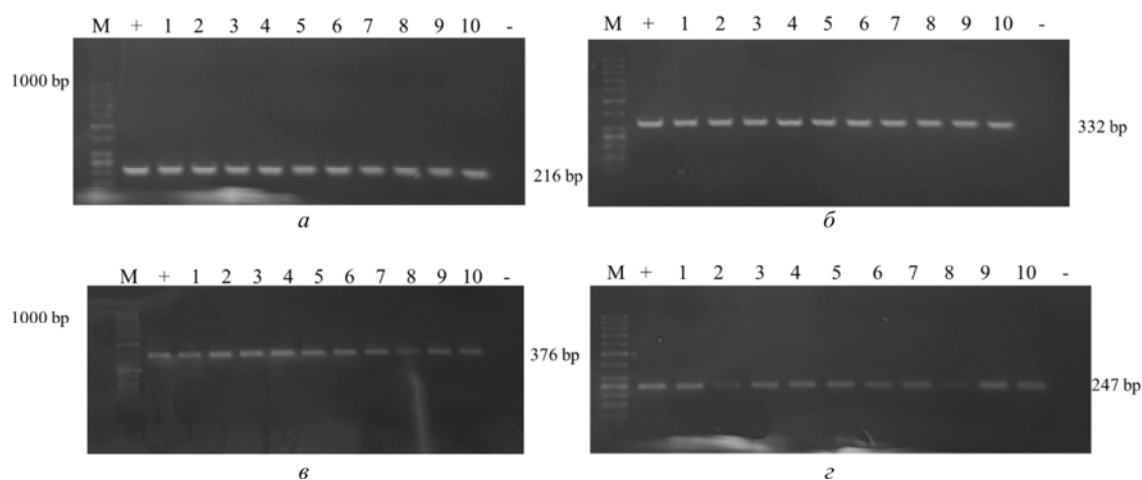


Рис. 1. Электрофорез продукта ПЦР четырех ДНК маркеров, специфичных для *B. licheniformis*: а – *ligD*; б – *BL00303*; в – *rfaB*; г – *serA* (Размеры последовательности продуктов ПЦР *ligD*, *BL00303*, *rfaB* и *serA* составляют 216, 332, 376 и 247 по соответственно; М – лестница ДНК 50 по; (+) – положительный контроль; (-) – отрицательный контроль; 1–10 – выделенные штаммы *B. licheniformis*)

конкретном штамме. Тем не менее обнаружение трех из четырех маркеров, специфичных для данного вида, служит очевидным доказательством правомерности идентификации штамма 9 как *B. licheniformis*. Эти результаты совместно подтверждают идентичность штаммов на уровне ДНК и согласуются с результатами идентификации методом MALDI-TOF.

На рис. 2 можно видеть, что все протестированные штаммы (колонки 1–10) показали четкие полосы усиления с ожидаемым размером согласованно с лестницей ДНК (М), в то время как негативный контроль (-) показал отсутствие амплификации, что подтверждает отсутствие загрязнения в тесте ПЦР.

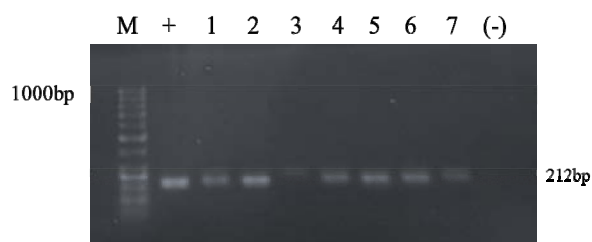


Рис. 2. Электрофорез продукта ПЦР ДНК-маркеров, специфичных для *B. subtilis* (М – лестница ДНК 50 по; (-) – отрицательный контроль; 1–10 – выделенные штаммы *B. licheniformis*)

Эти результаты означают, что все протестированные штаммы обладают последовательностью, специфической для *B. Subtilis*, и служат подтверждением идентификации на белковом уровне, выполненной при помощи метода масс-спектрометрии MALDI-TOF. Затем эти штаммы были протестированы с целью оценки профилей их лекарственной устойчивости.

Профили лекарственной устойчивости штаммов *B. licheniformis* и *B. subtilis*, выделенных

из продуктов переработки пурпурного ямса. Профили лекарственной устойчивости *B. licheniformis* представлены на рис. 3.

Профили лекарственной устойчивости 11 штаммов *B. Licheniformis*, выделенных из муки из пурпурного ямса, были определены при помощи диско-диффузионного метода в тесте Кирби – Бауэра с использованием 28 антибиотиков из 14 классов антимикробных препаратов. Все штаммы показали 100%-ную устойчивость к восьми антибиотикам, включая азтреонам, амоксициллин + клавулановая кислота, цефотаксим, эритромицин, налидиксовую кислоту, метициллин, цефтазидим и полимиксин В, что говорит о настораживающем профиле лекарственной устойчивости к широкому спектру препаратов. Далее устойчивость была обнаружена и к нескольким антибиотикам, ориентированным, прежде всего, на грамположительные бактерии: высокие уровни устойчивости были выявлены в отношении β-лактамов (метициллин – 100 %, пенициллин – 70 %, цефуроксим – 60 %) и эритромицина (100 %), что говорит о потенциальном наличии генов *tesA*, кодирующих измененные белки связи с пенициллином, или генов *erm*, связанных с устойчивостью к макролидам [15]. Помимо этого, устойчивость к стрептомицину (80 %) может указывать на продукцию ферментов, модифицирующих аминогликозиды. Сопутствующая устойчивость к препаратам, ориентированным на грамположительные бактерии (т.е. β-лактамы) и специфические граммотрицательные микроорганизмы (т.е. азтреонам), говорит о накоплении различных механизмов устойчивости, возможно, путем горизонтальной передачи генов в сельскохозяйственной среде. Универсальная уязвимость к имипенему, ципрофлоксацину и хлорамфениколу согласуется с данными CLSI для *Bacillus* (CLSI, 2023) и соответствует результатам исследования V. Ozkocaman et al. (2006) и S. Banerjee et al.

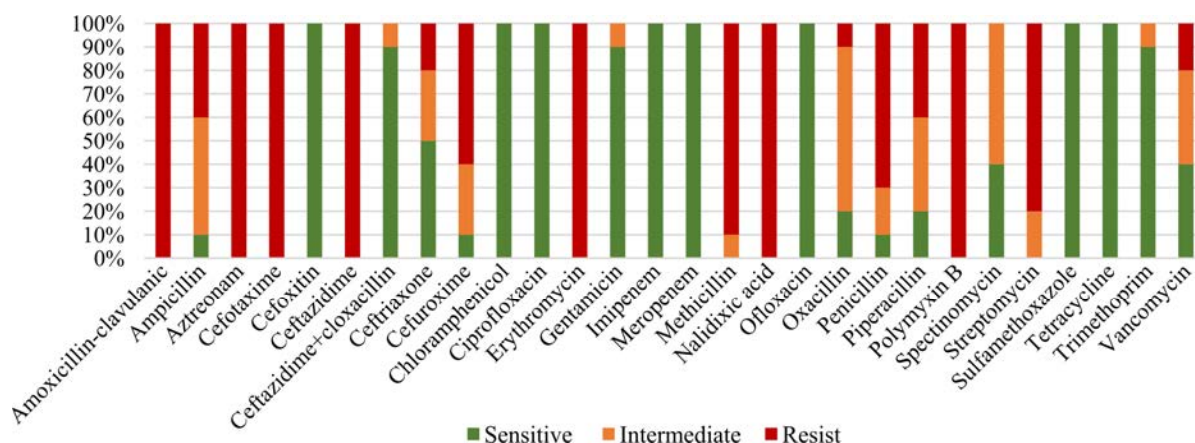


Рис. 3. Профиль лекарственной устойчивости *B. Licheniformis*, определенный на основании диаметра зоны подавления (мм) (красный – устойчивость, оранжевый – промежуточное состояние, зеленый – уязвимость)

(2007), хотя сохраняющаяся уязвимость к карбапенему заслуживает внимания с учетом увеличивающейся во всем мире устойчивости микроорганизмов к данному классу препаратов [16, 17]. Особо значимыми оказались неожиданные профили уязвимости к спектиномицину (40 %), сульфаметоксазолу (100 %) и триметоприму (90 %). Эта нетипичная уязвимость может быть объяснена: (1) отсутствием генов устойчивости *aadA* в сочетании с уникальными характеристиками проницаемости мембран, что облегчает спектиномицину доступ к его рибосомной цели (J. Davies и G.D. Wright, 1997)⁶ и (2) облигатной зависимостью от эндогенных механизмов синтеза фолатов вследствие дефицита механизмов поглощения фолатов из внешней среды (P. Huovinen et al., 1995)⁷. Штамм-зависимая вариабельность устойчивости к спектиномицину (40 % уязвимых штаммов и 60 % устойчивых) может отражать диф-

ференцированное выражение рибосомных РНК-метил трансфераз, в то время как универсальная уязвимость к триметоприму отличается от типичной распространенности генов *dfr* в бактериях почвы, и это говорит о необходимости дальнейшего исследования генома. Эти результаты подчеркивают важность изучения региональной лекарственной устойчивости, в особенности у видов *Bacillus*, присутствующих в продуктах питания и способных служить резервуаром распространения генов устойчивости.

Профили лекарственной устойчивости *B. subtilis* представлены на рис. 4.

Тесты на определение лекарственной устойчивости семи штаммов *B. subtilis* показали полную уязвимость (100 %) к хлорамфениколу, ципрофлоксацину, эритромицину, карбапенему (имипенему, меропенему), гентамицину, амоксициллин + клавулановую кислоту, цефотаксину, налидиксовой

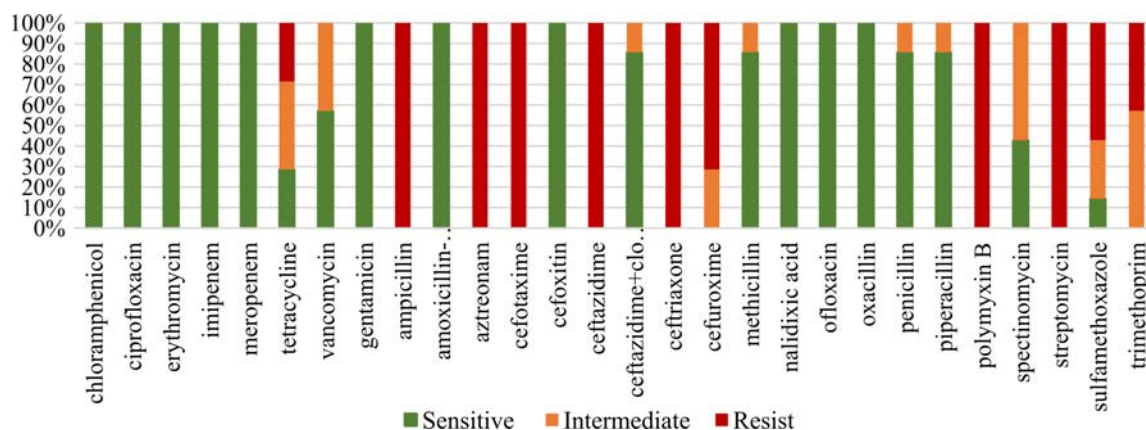


Рис. 4. Профиль лекарственной устойчивости *B. Subtilis*, определенный на основании диаметра зоны подавления (мм) (красный – устойчивость, оранжевый – промежуточное состояние, зеленый – уязвимость)

⁶ Davies J., Wright G.D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics // Trends Microbiol. – 1997. – Vol. 5, № 6. – P. 234–240. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)01033-0

⁷ Trimethoprim and sulfonamide resistance / P. Huovinen, L. Sundström, G. Swedberg, O. Sköld // Antimicrob. Agents Chemother. – 1995. – Vol. 39, № 2. – P. 279–289. DOI: 10.1128/aac.39.2.279

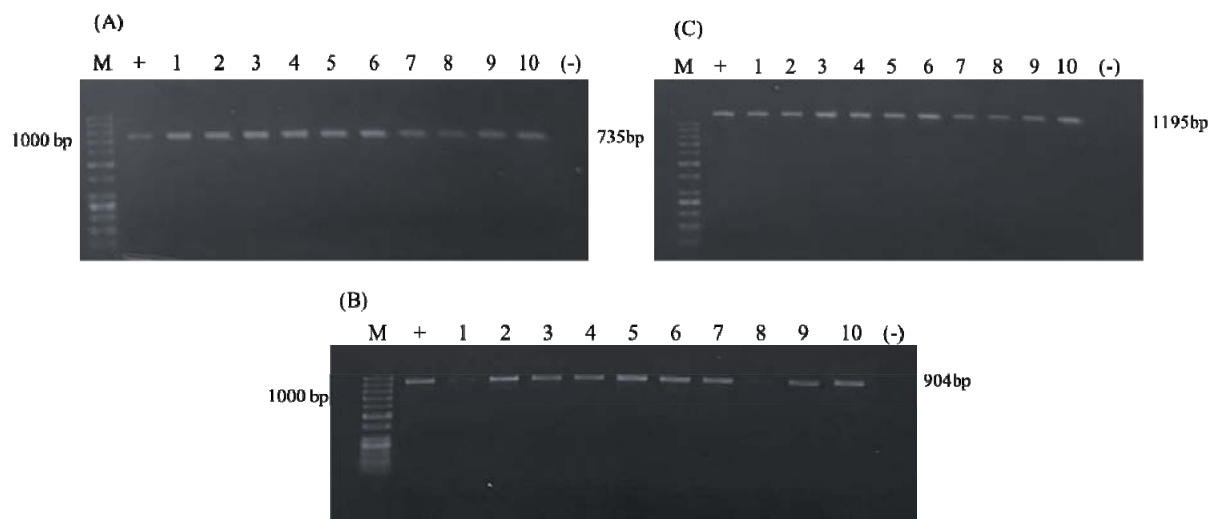


Рис. 5. Электрофорез продуктов ПЦР трех генов токсинов в *B. licheniformis*: (A) *licA*; (B) *licB*; (C) *licC* (размеры последовательности продуктов ПЦР *licA*, *licB* и *licC* составляют 735, 904 и 1195 по соответственно; М – лестница ДНК 50 по; (+) – положительный контроль; (-) – отрицательный контроль; 1–10 – выделенные штаммы *B. licheniformis*)

кислоте, офлоксацину, указывая на их сохраняющуюся терапевтическую эффективность. Однако наблюдалась и устойчивость к некоторым антибиотикам, включая 100%-ную устойчивость к ампициллину, азтреонаму, цефалоспорином третьего поколения (цефтазидим, цинфтриаксон, цефотаксим), полимиксину В и стрептомицину, что согласуется как с внутренними, так и приобретенными механизмами устойчивости. Удивительное восстановление уязвимости к цефтазидиму в комбинации с клотаксациллином (86 % уязвимости против 0 % только к цефтазидиму) говорит о том, что доминирующим механизмом является устойчивость, опосредованная β -лактамазой [18]. Особая клиническая значимость принадлежит промежуточной уязвимости к ванкомицину в 43 % штаммов, что потенциально означает возникающую устойчивость через модификацию предкурсора пептидогликана (т.е. замена D-Ala-D-Lac) [19]. Штаммы показали различную устойчивость к тетрациклину (29 % устойчивы, 43 % – промежуточное состояние) и спектиномицину (57 % промежуточное состояние), что предполагает гетерогенное распределение детерминантов устойчивости *tet* (M/O) и *spcN*. Эти результаты подчеркивают значимость постоянного мониторинга штаммов *B. subtilis* в продуктах питания.

Присутствие генов токсинов штаммов *B. licheniformis* и *B. Subtilis*, выделенных из муки из пурпурного ямса. Результаты тестов показали, что все 10 штаммов *B. licheniformis*, выделенных из муки из пурпурного ямса, являлись носителями всех трех генов токсинов *licA*, *licB* и *licC* (рис. 5). Это 100%-ное обнаружение говорит о широкой распространенности биосинтетического генетического кластера лихеницина в штаммах *B. Licheniformis*, содержащихся в пищевых продуктах во Вьетнаме.

Эти результаты согласуются с данными исследования Е.Н. Madslien et al. (2013), которые сообще-

ли, что все 53 штамма *B. Licheniformis*, выделенные из продуктов питания и внешнесредовых объектов, являлись носителями гена *lchAA* (гомолога *licA*), который кодирует синтетазу А лихеницина [20]. Еще в одном исследовании было подтверждено присутствие генов *licA*, *licB* и *licC* в штаммах *B. Licheniformis*, выделенных из образцов коровьего молока в Иране, это указывает на то, что распространенность данных генов не ограничивается продуктами питания растительного происхождения [13]. Распространенность генного кластера *licABC*, наблюдаемая в данном исследовании, сопоставима или превосходит ранее описанные уровни, что подчеркивает потенциальные риски здоровью, связанные с мукой из пурпурного ямса, продаваемой во Вьетнаме.

Все штаммы *B. Subtilis*, выделенные из муки из пурпурного ямса в рамках данного исследования, показали отрицательный результат в тестах на три основные группы генов энтеротоксинов, являющихся частыми причинами алиментарно-зависимых заболеваний, а именно генов *nhe*, *hbl* и *cytK* (рис. 6).

Результаты данных тестов свидетельствуют, что штаммы *B. subtilis* не содержат ключевые вирулентные факторы и вряд ли могут вызвать диарею у человека. Вывод данного исследования согласуется с результатами S. Ceuppens et al. (2013), которые сообщили, что большинство штаммов *B. Subtilis*, выделенных из пищевых продуктов, не содержали эти гены токсинов и редко продуцировали токсины, подобные продуцируемым *B. cereus* [21]. Подобным образом в исследованиях отмечалось, что *B. subtilis* связаны с очень низким уровнем риска алиментарно-зависимых заболеваний вследствие типичного для них отсутствия основных генов энтеротоксинов. Хотя нахождение *B. subtilis* в продуктах питания может указывать на несоблюдение гигиенических требований в процессе производства, результаты

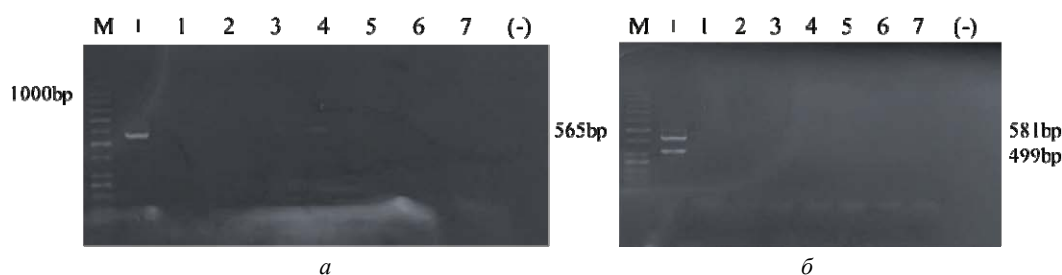


Рис. 6. Электрофорез продуктов ПЦР генов токсинов: а – *cytK*; б – *hbl* и *nhe* (М – лестница ДНК 50 по; (-) – отрицательный контроль; 1–7 – выделенные штаммы *B. subtilis*)

данного исследования позволяют считать, что этот вид бактерий не представляет собой значительную вирулентную угрозу, связанную с потреблением муки из пурпурного ямса.

Выводы. Данное исследование выявило более высокие уровни микробного загрязнения в образцах обработанных продуктов из ямса (мука) продающихся в точках розничной торговли, по сравнению с клубнями свежего ямса после сбора на поле. Содержание *B. licheniformis* и *B. subtilis* было обнаружено только в образцах муки. Все штаммы *B. licheniformis* являлись носителями генного кластера токсина *lscABC* и показали высокие уровни лекарственной устойчивости к широко распространенным антибиотикам, что можно рассматривать как фактор риска для здоровья потребителей.

В то же время в штаммах *B. subtilis* отсутствовали гены диарейных токсинов, и связанный с ними вирулентный риск был низок. Эти результаты вызывают некоторое беспокойство относительно мик-

робной безопасности продуктов на основе ямса, в особенности при наличии существующих пробелов в законодательстве Вьетнама, где микробиологические критерии непосредственно для ямса до сих пор не определены. Результаты нашего исследования подчеркивают срочную необходимость разработки и введения национальных стандартов микробиологической безопасности продуктов на основе ямса, а также усиления мер гигиенического контроля в процессе переработки ямса, особенно для маломасштабных производств и домашних хозяйств, с целью обеспечения безопасности продуктов питания для вьетнамских потребителей.

Финансирование. Авторы выражают глубокую благодарность за предоставление финансирования Национальному институту по контролю качества пищевых продуктов Вьетнама.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Thermostability and catechol-O-methyltransferase inhibitory activity of acylated anthocyanins from purple yam / R. Miyata, H. Sano, S. Hoshino, S. Kumazawa // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2022. – Vol. 86, № 7. – P. 916–921. DOI: 10.1093/bbb/zbac060
2. Isolation and characterization of starch from purple yam (*Dioscorea trifida*) / S. de Jesus Lopes Santos, M. Barbosa Pires, E.R. Amante, A.M. da Cruz Rodrigues, L.H. Meller da Silva // J. Food Sci. Technol. – 2021. – Vol. 59, № 2. – P. 715–723. DOI: 10.1007/s13197-021-05066-9
3. Ige M.T., Akintunde F.O. Studies on the local techniques of yam flour production // International Journal of Food Science and Technology. – 2007. – Vol. 16, № 3. – P. 303–311. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1981.tb01019.x
4. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis* / A. Muras, M. Romero, C. Mayer, A. Otero // Crit. Rev. Biotechnol. – 2021. – Vol. 41, № 4. – P. 609–627. DOI: 10.1080/07388551.2021.1873239
5. Banoon S., Ali Z., Salih T. Antibiotic resistance profile of local thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated from Maysan province soil // Comunicata Scientiae. – 2020. – Vol. 11. – P. e3291. DOI: 10.14295/cs.v11i0.3291
6. Lichenysin Production by *Bacillus licheniformis* Food Isolates and Toxicity to Human Cells / K.Y.C. Yeak, M. Perko, G. Staring, B.M. Fernandez-Ciruelos, J.M. Wells, T. Abee, M.H.J. Wells-Bennik // Front. Microbiol. – 2022. – Vol. 13. – P. 831033. DOI: 10.3389/fmicb.2022.831033
7. Kimelman H., Shemesh M. Probiotic Bifunctionality of *Bacillus subtilis* – Rescuing Lactic Acid Bacteria from Desiccation and Antagonizing Pathogenic *Staphylococcus aureus* // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, № 10. – P. 407. DOI: 10.3390/microorganisms7100407
8. 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, № 6. DOI: 10.1128/aem.68.6.3147-3151.2002
9. Genotyping and Toxigenic Potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* Strains Occurring in Industrial and Artisanal Cured Sausages / A. Matarante, F. Baruzzi, P.S. Cocconcetti, M. Morea // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, № 9. – P. 5168–5176. DOI: 10.1128/aem.70.9.5168-5176.2004
10. Potential health and safety risk of enterotoxin-producing *Bacillus* species isolated from fermentation effluents discharged into the environment / O.B. Daramola, N. Torimiro, R.K. Omole, T.O. Okugbesan, O.J. Olubamise, I.T. Akinsola, O.O. Akinfolarin // Discover Toxicology. – 2025. – Vol. 2. – P. 3. DOI: 10.1007/s44339-025-00020-2
11. Multiplex PCR identification and culture-independent quantification of *Bacillus licheniformis* by qPCR using specific DNA markers / E. Almeida, C.R. Serra, P. Albuquerque, I. Guerreiro, A.O. Teles, P. Enes, F. Tavares // Food Microbiol. – 2018. – Vol. 74. – P. 1–10. DOI: 10.1016/j.fm.2018.02.016

12. Xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng vi khuẩn *Bacillus subtilis* bằng kỹ thuật realtime PCR / Đặng Thị Hương, Trần Hồng Ba, Lê Thành Long, Nguyễn Văn Cường, Ninh Thị Hạnh, Nguyễn Thành Trung, Nguyễn Thị Xuân Hương, Lê Thị Hồng Hào // Vietnam Journal of Food Control (VJFC). – 2022. – Vol. 5, № 3. – P. 323–334. DOI: 10.47866/2615-9252/vjfc.3951
13. Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk / T. Nieminen, N. Rintaluoma, M.A. Andersson, A.-M. Taimisto, T. Alivahmas, A. Seppälä, O. Priha, M.S. Salkinoja-Salonen // Vet. Microbiol. – 2007. – Vol. 124, № 3–4. – P. 329–339. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.05.015
14. Saeed B.M.S., Abbas B.A., Al-Jadaan S.A.N. Detection of *Bacillus cereus* genes responsible for diarrheal and emetic toxins // J. Phys.: Conf. Ser. – 2021. – Vol. 1879, № 2. – P. 022034. DOI: 10.1088/1742-6596/1879/2/022034
15. Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome / Y. Agersø, K. Bjerre, E. Brockmann, E. Johansen, B. Nielsen, R. Siezen, B. Stuer-Lauridsen, M. Wels, A.A. Zeidan // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, № 1. – P. e0210363. DOI: 10.1371/journal.pone.0210363
16. Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and *Artemia* / S. Banerjee, T.N. Devaraja, M. Shariff, F.M. Yusoff // J. Fish Dis. – 2007. – Vol. 30, № 7. – P. 383–389. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2007.00819.x
17. *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes / V. Ozkocaman, T. Ozcelik, R. Ali, F. Ozkalemkas, A. Ozkan, C. Ozakin, H. Akalin, A. Ursavas [et al.] // J. Hosp. Infect. – 2006. – Vol. 64, № 2. – P. 169–176. DOI: 10.1016/j.jhin.2006.05.014
18. Rice L.B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones // Mayo Clin. Proc. – 2012. – Vol. 87, № 2. – P. 198–208. DOI: 10.1016/j.mayocp.2011.12.003
19. Rajput P., Nahar K.S., Rahman K.M. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Positive Bacteria // Antibiotics. – 2024. – Vol. 13, № 12. – P. 1197. DOI: 10.3390/antibiotics13121197
20. Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains / E.H. Madslien, H.T. Rønning, T. Lindbäck, B. Hassel, M.A. Andersson, P.E. Granum // Journal of Applied Microbiology. – 2013. – Vol. 115, № 4. – P. 1068–1080. DOI: 10.1111/jam.12299
21. Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles // FEMS Microbiol. Ecol. – 2013. – Vol. 84, № 3. – P. 433–450. DOI: 10.1111/1574-6941.12110

Распространенность и характеристика *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis* в продуктах из муки ямса во Вьетнаме как фактора риска здоровью / Као Конг Кханг, Нгуен Тхи Кью Анх, Пхам Нгок Ха, Нгуен Тханг Трунг, Тран Хонг Ба, Ле Тхи Хонг Хао // Анализ риска здоровью. – 2025. – № 3. – С. 83–94. DOI: 10.21668/health.risk/2025.3.09

UDC 613.26

DOI: 10.21668/health.risk/2025.3.09.eng

Read
online



Research article

OCCURRENCE AND CHARACTERIZATION OF *BACILLUS LICHENIFORMIS* AND *BACILLUS SUBTILIS* IN YAM POWDER PRODUCTS FROM VIETNAM AS A HEALTH RISK FACTOR

Cao Cong Khanh¹, Nguyen Thi Kieu Anh², Pham Ngoc Ha¹, Nguyen Thanh Trung¹, Tran Hong Ba¹, Le Thi Hong Hao¹

¹National Institute for Food Control, 65 Pham Than Duat Str., Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Pharmacy, 15 Le Thanh Tong Str., Hanoi, Vietnam

Yam (Dioscorea alata L.) is a carbohydrate-rich tuber crop widely consumed in tropical countries. This includes Vietnam, where both fresh yam and yam powder are part of traditional diets. Despite its popularity, the microbiological safety of yam-derived products has received limited scientific attention.

*This study investigated the microbial contamination and characterized *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* isolated from commercially available yam powder products in Vietnam. The results showed that while *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, or *Salmonella* spp. were not detected, varying levels of total aerobic bacteria, yeasts, and molds were present in most samples. *B. licheniformis* was the predominant species, isolated from five out of seven powder samples, while *B. subtilis* appeared in two. It should be noted that all *B. licheniformis* strains harbored the *licA*, *licB*, and *licC* genes responsible for lichenysin synthesis and displayed multidrug resistance to antibiotics such as erythromycin, amoxicillin-clavulanate, and cephalosporins. In contrast, *B. subtilis* strains lacked diarrheagenic toxin genes (*nhe*, *hbl*, *cytK*) and showed higher suscep-*

tibility to most antibiotics. These findings suggest that microbial contamination may occur during processing or storage and highlight the urgent need for updated microbial guidelines, targeted hygienic practices, and routine toxin gene screening to ensure safety and quality of yam-based food products in Vietnam.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, yam, antibiotic resistance, M45 CLSI, *bceT*, *cytK*, *hbl*, *nhe*, *licABC*.

References

1. Miyata R., Sano H., Hoshino S., Kumazawa S. Thermostability and catechol-O-methyltransferase inhibitory activity of acylated anthocyanins from purple yam. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2022, vol. 86, no. 7, pp. 916–921. DOI: 10.1093/bbb/zbac060
2. de Jesus Lopes Santos S., Barbosa Pires M., Amante E.R., da Cruz Rodrigues A.M., Meller da Silva L.H. Isolation and characterization of starch from purple yam (*Dioscorea trifida*). *J. Food Sci. Technol.*, 2021, vol. 59, no. 2, pp. 715–723. DOI: 10.1007/s13197-021-05066-9
3. Ige M.T., Akintunde F.O. Studies on the local techniques of yam flour production. *International Journal of Food Science and Technology*, 2007, vol. 16, no. 3, pp. 303–311. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1981.tb01019.x
4. Muras A., Romero M., Mayer C., Otero A. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 41, no. 4, pp. 609–627. DOI: 10.1080/07388551.2021.1873239
5. Banoon S., Ali Z., Salih T. Antibiotic resistance profile of local thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated from Maysan province soil. *Comunicata Scientiae*, 2020, vol. 11, pp. e3291. DOI: 10.14295/cs.v11i0.3291
6. Yeak K.Y.C., Perko M., Staring G., Fernandez-Ciruelos B.M., Wells J.M., Abee T., Wells-Bennik M.H.J. Lichenysin Production by *Bacillus licheniformis* Food Isolates and Toxicity to Human Cells. *Front. Microbiol.*, 2022, vol. 13, pp. 831033. DOI: 10.3389/fmicb.2022.831033
7. Kimelman H., Shemesh M. Probiotic Bifunctionality of *Bacillus subtilis* – Rescuing Lactic Acid Bacteria from Desiccation and Antagonizing Pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 10, pp. 407. DOI: 10.3390/microorganisms7100407
8. 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. DOI: 10.1128/aem.68.6.3147-3151.2002
9. Matarante A., Baruzzi F., Cocconcelli P.S., Morea M. Genotyping and Toxigenic Potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* Strains Occurring in Industrial and Artisanal Cured Sausages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 9, pp. 5168–5176. DOI: 10.1128/aem.70.9.5168-5176.2004
10. Daramola O.B., Torimiro N., Omole R.K., Okugbesan T.O., Olubamise O.J., Akinsola I.T., Akinfolarin O.O. Potential health and safety risk of enterotoxin-producing *Bacillus* species isolated from fermentation effluents discharged into the environment. *Discover Toxicology*, 2025, vol. 2, pp. 3. DOI: 10.1007/s44339-025-00020-2
11. Almeida E., Serra C.R., Albuquerque P., Guerreiro I., Teles A.O., Enes P., Tavares F. Multiplex PCR identification and culture-independent quantification of *Bacillus licheniformis* by qPCR using specific DNA markers. *Food Microbiol.*, 2018, vol. 74, pp. 1–10. DOI: 10.1016/j.fm.2018.02.016
12. Đặng Thị Hường, Trần Hồng Ba, Lê Thành Long, Nguyễn Văn Cường, Ninh Thị Hạnh, Nguyễn Thành Trung, Nguyễn Thị Xuân Hường, Lê Thị Hồng Hào. Xây dựng phương pháp phát hiện và định lượng vi khuẩn *Bacillus subtilis* bằng kỹ thuật realtime PCR. *Vietnam Journal of Food Control (VJFC)*, 2022, vol. 5, no. 3, pp. 323–334. DOI: 10.47866/2615-9252/vjfc.3951
13. Nieminen T., Rintaluoma N., Andersson M.A., Taimisto A.-M., Aliviermas T., Seppälä A., Priha O., Salkinoja-Salonen M.S. Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet. Microbiol.*, 2007, vol. 124, no. 3–4, pp. 329–339. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.05.015
14. Saeed B.M.S., Abbas B.A., Al-Jadaan S.A.N. Detection of *Bacillus cereus* genes responsible for diarrheal and emetic toxins. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2021, vol. 1879, no. 2, pp. 022034. DOI: 10.1088/1742-6596/1879/2/022034
15. Agersø Y., Bjerre K., Brockmann E., Johansen E., Nielsen B., Siezen R., Stuer-Lauridsen B., Wels M., Zeidan A.A. Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 1, pp. e0210363. DOI: 10.1371/journal.pone.0210363

© Cao Cong Khanh, Nguyen Thi Kieu Anh, Pham Ngoc Ha, Nguyen Thanh Trung, Tran Hong Ba, Le Thi Hong Hao, 2025
Cao Cong Khanh – Head of Research and Development Department (e-mail: khanhcc@nifc.gov.vn; tel.: +84 943 850 316; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-9001-9462>).

Nguyen Thi Kieu Anh – lecturer (e-mail: nhnguyenkieu@gmail.com; tel.: +84 915 158 462; ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-1127-0729>).

Pham Ngoc Ha – Reseacher of Laboratory of Food Microbiology and Genetically Modified Food (e-mail: hpn0411@gmail.com; tel.: +84 963 991 575; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-1248-3404>).

Nguyen Thanh Trung – Head of Laboratory of Food Microbiology and Genetically Modified Food (e-mail: trungnt@nifc.gov.vn; tel.: +84 349 363 269; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8732-9911>).

Tran Hong Ba – Reseacher of Laboratory of Food Microbiology and Genetically Modified Food (e-mail: ba.pt070488@gmail.com; tel.: +84 984 316 925).

Le Thi Hong Hao – director (e-mail: lethihonghao@yahoo.com; tel.: +84 904 248 167; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3570-8570>).

16. Banerjee S., Devaraja T.N., Shariff M., Yusoff F.M. Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, 2007, vol. 30, no. 7, pp. 383–389. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2007.00819.x
17. Ozkocaman V., Ozcelik T., Ali R., Ozkalemkas F., Ozkan A., Ozakin C., Akalin H., Ursavas A. [et al.]. *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes. *J. Hosp. Infect.*, 2006, vol. 64, no. 2, pp. 169–176. DOI: 10.1016/j.jhin.2006.05.014
18. Rice L.B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clin. Proc.*, 2012, vol. 87, no. 2, pp. 198–208. DOI: 10.1016/j.mayocp.2011.12.003
19. Rajput P., Nahar K.S., Rahman K.M. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics*, 2024, vol. 13, no. 12, pp. 1197. DOI: 10.3390/antibiotics13121197
20. Madslien E.H., Rønning H.T., Lindbäck T., Hassel B., Andersson M.A., Granum P.E. Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains | Journal of Applied Microbiology. *J. Appl. Microbiol.*, 2013, vol. 115, no. 4, pp. 1068–1080. DOI: 10.1111/jam.12299
21. Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2013, vol. 84, no. 3, pp. 433–450. DOI: 10.1111/1574-6941.12110

Cao Cong Khanh, Nguyen Thi Kieu Anh, Pham Ngoc Ha, Nguyen Thanh Trung, Tran Hong Ba, Le Thi Hong Hao. Occurrence and characterization of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in yam powder products from Vietnam as a health risk factor. *Health Risk Analysis*, 2025, no. 3, pp. 83–94. DOI: 10.21668/health.risk/2025.3.09.eng

Получена: 16.06.2025

Одобрена: 30.08.2025

Принята к публикации: 26.09.2025