

організованій клітинній системі клітин гранульози кролематок (з концентрацією $1,0 \times 10^6$ клітин/мл) у середовищі з гіалуроновою кислотою (0,5 мг/мл) та інсуліном в дозі 10 мкг/мл було сформовано контрольну та дві дослідні групи, які відрізнялися між собою різною концентрацією наночастинок срібла. Клітини першої дослідної групи культивувалися у середовищі з концентрацією наночастинок срібла 0,1 мкг/мл, а другої – 1 мкг/мл. Співкультивування ОКК на клітинній системі гранульози проводили у середовищі 199 з 10 % ФСК та 50 мкг/мл гентаміцину впродовж 24-х годин. Через 24 години культивування визначали кількість та життєздатність клітин гранульози, оцінювали якість ОКК та визначали біохімічні показники функціонального стану клітин (вміст холестеролу, активність ЛДГ) у кондиційному середовищі.

Результатами досліджень встановлено високий рівень проліферації та відмінної морфологічної якості клітин всіх груп впродовж культивування, що вказує на відсутність цитотоксичного впливу наночастинок срібла в досліджуваних концентраціях. Вірогідних різниць у проліферативній активності та життєздатності клітин між контролем та дослідними групами при додаванні наночастинок срібла впродовж 24-ох годин культивування не виявлено. При порівнянні ступеня дозрівання ОКК до метафази-2 у 1-й дослідній групі з концентрацією наночастинок срібла 0,1 мкг/мл виявлено найвищий відсоток дозрілих ооцитів – 87 %, тоді як у 2-й дослідній групі з концентрацією наночастинок срібла 1 мкг/мл ступінь дозрівання ОКК становив 73 % проти 83 % ооцитів у контрольній групі. При визначенні активності ЛДГ, рівня стероїдогенезу, біосинтезу холестеролу в кондиційному середовищі не встановлено вірогідних змін цих показників за умов культивування між контрольною та дослідними групами.

Отже, додавання до основного середовища 199 з гіалуроновою кислотою наночастинок срібла в концентрації 0,1 мкг/мл та інсуліну в концентрації 10 мкг/мл за умов використання комбінованої просторово-організованої клітинної системи гранульози для дозрівання ОКК забезпечує підвищення проліферативної активності та метаболічних процесів в культурі клітин гранульози, що викликає підвищення їх якості та дозрівання 87 % ОКК до метафази-2.

УДК 664.019:579.67

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА АЕРОБНИХ ТА ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНИХ СПОРОУТВОРЮЮЧИХ КОНТАМІНАНТІВ ХАРЧОВОЇ ПРОДУКЦІЇ

Ямборко Г.В., Пилипенко Л.М., Пилипенко І.В., Назаренко Г.М.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Україна

jamborko@mail.ru

Превентивний аналіз ризиків, які несуть аеробні та факультативно-анаеробні спороутворюючі мікроорганізми роду *Bacillus*, вкрай важливі для харчових галузей агропромислового комплексу України, теоретично необхідні і практично доцільні, бо дозволяють виробляти нові конкурентоспроможні харчові продукти гарантованої якості та мікробіологічної безпеки. Тому метою даної роботи було розробка наукових основ прискореного визначення санітарної якості та безпеки харчової сировини і продуктів її переробки шляхом диференційованої молекулярно-біологічної діагностики мікроорганізмів-контамінантів роду *Bacillus* за їх генетичними детермінантами. Мікроорганізми групи *Bacillus*

cereus викликають хвороби харчового походження та є потенційно ентеротоксичними для людини, тому швидка детекція *B. cereus* у продуктах харчування має вирішальне значення.

Для імітації інфікування та пошуку бактерій *B. cereus* та їх ДНК у зразках харчової продукції використовували штами бактерій роду *Bacillus* з колекції культур практично корисних і морських мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова, а також штами бацил, ізольовані з рослинної сировини, районованій в Україні та вирощеній в Одеській області, та з консервів з ознаками псування.

Спосіб попередньої обробки проб різних видів харчової продукції, з центрифугуванням зразків рідини, отриманої з консервів та рослинної сировини, протягом 1 хв. при 2000 об/хв. для видалення залишків органічних речовин, та подальшим фільтруванням через нітроцелюлозні мембранні фільтри «Millipore» d 0,22 мкм, був обраний для подальших досліджень; саме така попередня підготовка дає змогу аналізувати підвищену кількість зразків, що сприятиме кращому виявленню регламентованих у ній бацилярних контамінантів. Для швидкого виділення з фільтру і очищення ДНК бактеріальних клітин використовували набір F1021 (SureFast® PREP Bacteria, CONGEN Biotechnologie GmbH, Germany), надалі проводили визначення бактерій групи *B. cereus* за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції.

Харчові отруєння, які викликані присутністю *Bacillus cereus* у продуктах харчування як рослинного, так тваринного і змішаного походження, реєструють практично в усіх країнах. Також відомо, що *Paenibacillus polymyxa* та *Paenibacillus macerans* досить широко поширені у ґрунтах та можуть викликати псування овочевих та фруктових консервів, а також інфікувати консерви під час охолодження банок у автоклавах. Для перевірки достовірності результатів виявлення природного забруднення бацилами з використанням ПЛР було використано різні комбінації штамів бактерій цих трьох видів за застосування певних праймерів. Праймери були обрані на підставі даних літератури та синтезовані ТОВ НПФ «Сіместа ВААЛ» (Одеса, Україна). Було використано 3 пари видоспецифічних праймерів: 1) *nhe AF*, *nhe AR* для ентеротоксичного гену *nhe A*, який найбільш поширений серед ентеротоксигенних представників виду *Bacillus cereus*, та грає основну роль у харчових отруєннях; 2) 29PpF, 179PpR для специфічної ділянки 16S рРНК виду *Paenibacillus polymyxa*; 3) MAC 1, MAC 2 для специфічної ділянки 16S рРНК виду *Paenibacillus macerans*. Праймери *nhe A F* та *nhe A R* утворювали амплікони розміром 553 п.о. у ПЛР зі штамми, що відносяться до виду *B. cereus*, праймери 29PpF, 179PpR утворювали амплікони розміром 150 п.о. з штамом виду *P. polymyxa*, праймери MAC 1, MAC 2 утворювали амплікони розміром 100 п.о. з штамом виду *P. macerans*.

Оптимізовано температурні параметри ПЛР для відпалу праймерів *nhe AF* і *nhe AR* гена до *nhe A* виду *B. cereus*, що становить 50 °С, а також доведено специфічність ПЛР відсутністю продуктів ампліфікації при використанні ДНК бактерій *Escherichia coli* УКМВ 906, *Clostridium perfringens*, *Geobacillus stearothermophilus* ВКМ-В-718 і *Staphylococcus aureus* ОНУ 223 в ПЛР з праймерами до видоспецифічних регіонів регламентованих видів бацил – *Bacillus cereus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus macerans*. Встановлено високу чутливість ПЛР при проведенні аналізу на модельній суміші колекційних штамів *B. cereus* з використаними праймерами, яка становить 10² КУО/мл, що дозволяє розробити сучасний прискорений метод індикації, який не поступається закордонним.

Таким чином, проведення полімеразної ланцюгової реакції з підібраними високоспецифічними оліонуклеотидними праймерами надає можливість ідентифікації індивідуальних контамінантів харчової продукції – бактерій видів *B. cereus*, *P. polymyxa* та *P. macerans*.