

Droual, R.P. Chin, H.P. Shivaprasad, R.L. Walker // Avian Dis., 1996, 40:865-874.

5. Hafez, H.M. Investigation on different *Ornithobacterium rhinotracheale* «ORT» isolates / H.M. Hafez, R.R. Sting. // Avian Dis., 1999, 43:1-7.

6. Van Beek, P.P. Ademhaligs problemen, groeivertraging en gewrichtsontsteking bij kalkoenen en Vleeskuikens door een Pasteurella-achtige bacterie *Ornithobacterium rhinotracheale* "Taxon 28" / P.P. van Beek, P.H.

van Empel, H.F. van den Bosch, P.P. Storm, J.E. Bongers, J.W. du Preez // Tijdschr.Diergeneesk., 1994, 119:99-101.

7. Van Empel, P.H. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review / P.H. van Empel., H.M. Hafez // Avian pathology, 1999, 28:217-227.

8. Van Empel, P.H. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale* / P.H. van Empel P.H., T.U. van Den Bosch, P.R. Loeffen, P.P. Storm // J. CLIN. MICROBIOL. 1997, 35:418-421.

УДК 602.3:579.8

РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *VACILLUS MESENERICUS* В ОБЪЕКТАХ САНИТАРНОГО НАДЗОРА

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор*

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор*

Алешкин Андрей Владимирович, доктор биологических наук **

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент*

Мерчина Светлана Васильевна, кандидат биологических наук, доцент*

Батраков Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, доцент***

Юдина Мария Александровна, аспирант*

Макеев Владимир Александрович, аспирант*

Романова Надежда Александровна, аспирант*

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

**ФБУН «Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»

***ФГБОУ ВПО «Ульяновский ГПУ им. И.Н. Ульянова»

432017, г Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1 feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Vacillus mesentericus*, фаги, реакция нарастания титра фага, параметры, объекты санитарного надзора.

В статье описаны результаты исследований по разработке схемы ускоренной индикации бактерий *Vacillus mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания при помощи реакции нарастания титра фага. Время исследования составляет 25 часов. Определяемая при постановке реакции нарастания титра фага концентрация микроорганизмов - 10^2 м.к. бактерий *V. mesentericus* бб в 1 мл водопроводной воды и 10^3 м.к. бактерий *V. mesentericus* бб – в 1 г муки пшеничной, перца черного молотого и мяса.

Бактерии *Vacillus mesentericus*, так же как и *Vacillus subtilis* являются возбудителями болезней печеного хлеба и макарон. Разрушение структуры хлеба и разложение содержащихся в нем веществ, связано с продуцированием этими видами бактерий активных протеолитических и амилаолити-

ческих ферментов. При контаминации пищевых продуктов *Vacillus mesentericus* происходит ферментативный распад белковых и липидных компонентов с образованием опасных для здоровья соединений. Поэтому использование в пищевой и консервной промышленности некоторых добавок, на-

пример, специй, агара и желатина, способствует в ряде случаев порче ряда кулинарных изделий и продуктов [1].

Учитывая сложность идентификации бацилл первой морфологической группы, к которым относятся бактерии *Bacillus mesentericus*, остается актуальной проблема унифицированной схемы бактериологического исследования сырья и пищевых продуктов на наличие бацилл, вызывающих их порчу [6,7]. В связи с этим повышается значимость бактериофагов как специфичного инструмента для индикации микроорганизмов, позволяющего точно идентифицировать пищевые контаминанты, а также осуществлять более детальную дифференциацию отдельных биотипов и фаговаров внутри вида. Возможность фагоидентификации вытекает из специфичности действия бактериофагов, которая может быть настолько выражена, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида. Поэтому все большее число исследователей предпочитают использовать фаговые тесты, как высокоспецифичный метод, способный дифференцировать близкородственные штаммы [3, 5].

Цель и задачи исследования

Разработать схему индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания.

Для достижения поставленной цели необходимо определить параметры постановки реакции нарастания титра фага с биопрепаратами на основе фагов *B. mesentericus* и разработать схему постановки реакции нарастания титра фага с образцами объектов санитарного надзора.

Материалы и методы

Штамм бактерий *B. mesentericus* 44, полученный из музея кафедры микробио-

логии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Штамм бактериофага Bm-20 УГСХА, выделенный из пробы почвы п. Салмановка Ульяновского района Ульяновской области в 2011 году.

В качестве объектов исследования использовали стерильный мясо-пептонный бульон, пробы водопроводной питьевой воды, перца черного молотого, мяса и муки пшеничной

Обнаружение бактерий *B. mesentericus* в водопроводной воде, кормах и пищевых продуктах проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методикам В.Д. Тиманова и Д.М. Гольдфарба [4], С.Н. Золотухина [2].

Результаты исследований

Проведены эксперименты с использованием мясо-пептонного бульона (МПБ), контаминированного 18-часовой индикаторной культурой (*B. mesentericus* б6 в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным и отработанной С.Н. Золотухиным [2] (табл. 1).

Экспериментальным путем нами установлено, что количество фаговых частиц в опытной пробирке более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольной пробе, при контаминации бактериями *B. mesentericus* МПБ в концентрации 10^2 м.к./мл. и более (табл. 2).

Далее, для определения оптимального времени, обеспечивающего наиболее полное взаимодействие исследуемого фага с бактериями, нам необходимо было про-

Таблица 1

Оценка реакции нарастания титра фага (РНФ)

Увеличение количества корпускул индикаторного фага в опытной пробе (пробирка №1) в отношении к количеству корпускул в контроле (пробирка №3)	Оценка
Увеличение в 2,5 раза	Сомнительная
Увеличение от 3 до 5 раз	Слабо положительная
Увеличение свыше 5 раз	Положительная
Увеличение более 10 раз	Резко положительная

Таблица 2

Результаты исследования по подбору оптимальной концентрации бактерий

Объект исследования - контаминированный бак- териями <i>B. mesentericus</i> МПБ в дозе: (м.к. в 1 г)	Контроль индика- торного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
10 ⁴	32 ± 2,4	-	Полный лизис	Более 10
10 ³	32 ± 2,4	-	340 ± 8	8
10 ²	32 ± 2,4	-	160 ± 7	5
10 ¹	32 ± 2,4	-	65 ± 4	2

Таблица 3

Результаты исследования по подбору времени контакта исследуемого материала с фагом

№ п.п.	Время контакта исследуемого материала с фагом (часы)	Количество <i>Bacillus mesentericus</i> , обнаруживаемое с помощью	Время исследований (в часах)
1.	6	10 ²	25
2.	10	10 ²	29
3.	16	10 ²	35
4.	24	10 ¹	43

вести эксперименты на тест-объекте (в данном случае, МПБ, контаминированный *B. mesentericus* 66). Это было необходимо для выявления временного показателя, характеризующего наиболее полное взаимодействие фага и индикаторной культуры, при сохранении остальных параметров постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) (установлена оптимальная концентрация бактерий, температура культивирования – 37 °С).

Схема постановки эксперимента (рис. 1): контаминированный бактериями *B. mesentericus* 66 в концентрации 10² не подращивали в условиях термостата, а сразу же после встряхивания колб в шуттель-аппарате вносили в пробирки. Для каждого опыта использовали по три набора из 3 пробирок. В пробирки № 1 и № 2 вносили исследуемый материал из колб в количестве 9 мл. В пробирку № 3 вносили 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1 и № 3 добавляли по 1 мл индикаторного фага в концентрации 10⁴ фаговых корпускул в миллилитре, в пробирку № 2 вносили 1 мл стерильного МПБ и помещали в термостат при температуре 37 °С:

- первый набор на 6 часов,

- второй – на 10 часов,
- третий – на 16 часов,
- четвертый – на 24 часа.

По окончании инкубирования из каждой пробирки брали по 0,25 мл материала и вносили в пробирку с 4,5 мл МПБ (для получения в контроле на индикаторный фаг считываемого количества негативных колоний). Содержимое всех пробирок фильтровали через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV) и подвергали дальнейшему исследованию методом агаровых слоев по Грация [].

Полученные экспериментальные данные позволяют считать наиболее оптимальным временной режим реакции нарастания титра фага (РНФ) при 6-часовой экспозиции исследуемого материала с фагом без дополнительного подращивания микроорганизмов, находящихся в исследуемом субстрате. В данном опыте время исследования - 25 часов (0,5 часа – подготовка реакции + 6 часов – время экспозиции субстрата с фагом + 0,5 часа – постановка реакции (метод агаровых слоев по Грация) + 18 часов – время инкубирования), нам удастся провести индикацию бактерий *B. mesentericus* в концентрации 10²

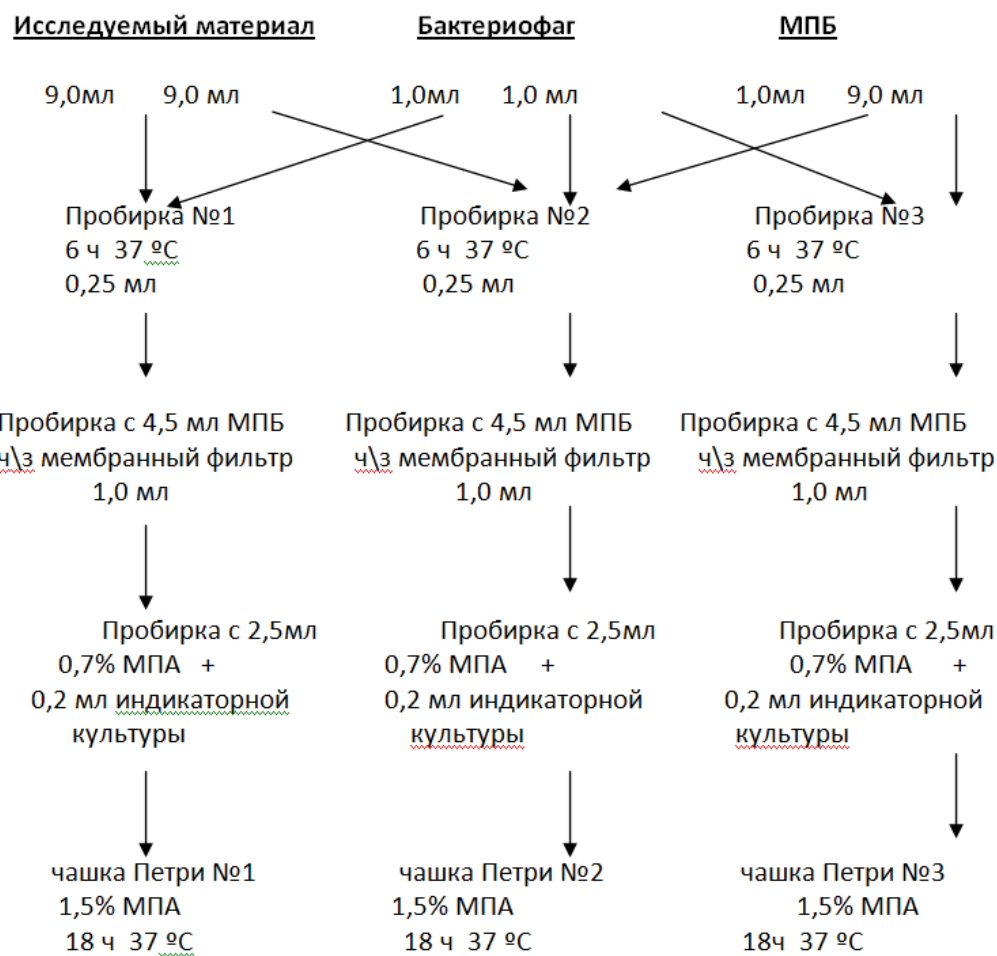


Рис. 1- Схема постановки реакции нарастания титра фага с использованием специфичного бактериофага

м.к. в миллилитре исследуемого субстрата (жидкой консистенции). Увеличение времени инкубирования исследуемого материала с фагом до 10-24 часов не повышает чувствительность метода (табл. 3).

Следующим этапом наших исследований была отработка схемы постановки реакции нарастания титра селекционированного фага на образцах объектов санитарного надзора.

Для этого исследовали образцы водопроводной питьевой воды, перца черного молотого, мяса и муки пшеничной.

Пробы образцов объектов санитарного надзора (водопроводная вода, комбикорм, перец черный молотый, мясо свинина) в объеме 10 г (мл) вносили в колбы и искусственно контаминировали 18-часовым штаммом *Bacillus mesentericus* бб в концентрации $10^1 - 10^5$ м.к./мл, заливали МПБ из

расчета 10 мл бульона на 1 г (мл) пробы. Пробы мяса (кусочки свинины) растирали в фарфоровой ступке. Для контроля использовали колбы с пробами, неконтаминированными бактериями *Bacillus mesentericus* бб.

По результатам проведенной серии опытов установлено, что увеличение титра фага Vm-20 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации 10^2 м.к. бактерий *B. mesentericus* бб в 1 мл водопроводной воды и 10^3 м.к. бактерий *B. mesentericus* бб – в 1 г муки пшеничной, перца черного молотого и мяса. Данные концентрации имеют диагностическое значение.

В результате проведенных исследований были выполнены поставленные задачи. Доказана возможность применения РНФ с целью обнаружения бактерий *B. mesentericus* в объектах санитарного надзора, позволяющая сократить время исследования, уменьшить расход питательных сред и лабо-

раторной посуды, повысить эффективность обнаружения картофельной палочки.

Библиографический список

1. Галкина, Т.А. Выделение протеолитических ферментов из *Bacillus mesentericus* и изучение их свойств / Т.А. Галкина, А.А. Бондарчук, М.М. Пасечник // *Mikrobiol. Zh.* - № 9. - 1977. - С. 286.

2. Золотухин, С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев // *Ульяновск*, 2005. - С.20-25.

3. Малофеева, Н.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Escherichia coli O157* и их применение в диагностике / Н.И. Малофеева // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Саратов, 2004. - 20 с.

4. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания

титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Гольдфарб Д.М. // *М.*, 1962. - С. 65-71.

5. Феоктистова, Н.А. Разработка фаговых препаратов индикации и идентификации бактерий рода *Bacillus* в пищевом сырье и продуктах питания / Д.А. Васильев, А.Х. Мустафин, А.И. Калдыркаев // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов прошлое, настоящее, будущее», посвященного 90-летию Заслуженного профессора Московского университета Н.С. Егорова 27-29 января 2011 года. - Москва, 2011. - 86 с.

6. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In: *Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio)*, 1973. - V.1. - P.71-88.

7. Boeye, A. Numerical taxonomy of *Bacillus* isolates from North Sea sediments / A. Boeye // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1976. - 26. - N 4. - P.427-441.

УДК 579.22: 53.047

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ *SACCHAROMICES CEREVISAE* ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Генинг Татьяна Петровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой «Физиология и патофизиология»

Долгова Динара Ришатовна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Физиология и патофизиология»

Абакумова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Физиология и патофизиология»

Генинг Снежанна Олеговна, студентка 4 курса медицинского факультета, стажер-исследователь лаборатории молекулярной и клеточной биологии.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»,
432017, г.Ульяновск, ул.Л.Толстого, 42, (8422)327071, Naum-53@yandex.ru;

Ключевые слова: фемтосекундное лазерное излучение, *Saccharomices cerevisae*, система «перекисное окисление липидов-антиоксиданты».

С целью оценки влияния фемтосекундного лазерного излучения на микроорганизмы оценивали в культуральной среде *Saccharomices cerevisae* уровень малонового диальдегида, глутатиона восстановленного и окисленного, активности каталазы, а также ригидность мембраны и жизнеспособность исследуемых клеток.

Введение

Изучение влияния различных физических факторов на биологическую активность ценных микроорганизмов, таких как

дрожжи, имеет большое теоретическое и практическое значение. Дрожжевые клетки (*Saccharomices cerevisae*) используются как модельные клеточные системы при оценке