

Министерство сельского хозяйства и продовольствия  
Республики Беларусь

Учреждение образования  
«Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия  
ветеринарной медицины»

Кафедра микробиологии и вирусологии

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА  
КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖИВОТНЫХ В НОРМЕ  
И ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ**

**РЕКОМЕНДАЦИИ**

Витебск  
ВГАВМ  
2017

УДК 636:612.336.3 : 616.34-008.87

ББК 45.273

О62

Утверждены Департаментом ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 23 марта 2017 года, № 02-1-31/6

Авторы:

кандидат ветеринарных наук, доцент *В. Н. Алешкевич*, кандидат ветеринарных наук, доцент *И. А. Субботина*, доктор ветеринарных и биологических наук, профессор *П. А. Красочко*, и.о. директора РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук *Ю. В. Ломако*, аспирант *Мурад Маалуф Бешара Тони*, ассистент *С. А. Сыса*, кандидат ветеринарных наук, доцент *А. А. Гласкович*, кандидат ветеринарных наук, доцент *Е. А. Капитонова*, кандидат ветеринарных наук, доцент *П. П. Красочко*

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, доцент *В. А. Герасимчик*; кандидат ветеринарных наук, доцент *А. И. Жуков*

**О62** **Определение микробиоценоза кишечного тракта животных в норме и при дисбактериозах : рекомендации / В. Н. Алешкевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2017. – 40 с.**  
ISBN 978-985-512-991-3.

Рекомендации предназначены для студентов, обучающихся по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина», ветеринарных специалистов, научных сотрудников, аспирантов, слушателей факультета повышения квалификации и переподготовки кадров. В рекомендациях изложен состав и физиологическое значение микрофлоры кишечника животных, этапы микробиологических исследований по определению ее состава.

**УДК 619:579.842.17(07)**  
**ББК 45.273**

**ISBN 978-985-512-991-3**

© Алешкевич В. Н. [и др.], 2017  
© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1. Состав и физиологическое значение микрофлоры кишечника	5
2. Подготовка материала для исследования микрофлоры желудочно-кишечного тракта	10
2.1. Приготовление разведений фекалий животных	10
2.2. Учет колониеобразующих единиц (КОЕ)	10
3. Этапы микробиологических исследований по определению состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных	11
3.1. Определение общего количества кишечных палочек	12
3.2. Определение общего количества лакто- и бифидобактерий	15
3.3. Определение общего количества бацилл	23
3.4. Определение общего количества клостридий	26
3.5. Определение общего количества бактероидов	30
3.6. Определение общего количества стрептококков	32
3.7. Определение общего количества актиномицетов, дрожжеподобных и плесневых грибов	35
3.8. Определение общего количества стафилококков	36
3.9. Определение общего количества аэробных микробов (микробного числа) в 1 г исследуемого материала методом серийных разведений на физрастворе с последующим высевом в чашки Петри с МПА	38
Литература	38

## ВВЕДЕНИЕ

Микробиоценоз организма млекопитающих, включая сельскохозяйственных, домашних животных и человека, стали изучать вместе с развитием микробиологии как науки, с появлением великих открытий Л. Пастера, Р. Коха,

И. И. Мечникова, их учеников и сотрудников. Так, в 1885 г. Т. Эшерих выделил из фекалий детей обязательного представителя микрофлоры кишечника – кишечную палочку, встречающуюся практически у всех млекопитающих, птиц, рыб, рептилий, амфибий, насекомых и т.д. Через 7 лет появились первые данные о значении кишечной палочки для жизнедеятельности, здоровья макроорганизма. С. О. Иенсен (1893) установил, что разные типы и штаммы кишечной палочки могут быть как патогенными для животных (вызывают у телят септическое заболевание и диарею, у поросят – отечную болезнь, у многих видов животных – менингоэнцефалит), так и непатогенными, т.е. совершенно безвредными и даже полезными обитателями кишечника животных и человека.

Г. Тиссье в 1900 г. открыл в фекалиях новорожденных детей бифидобактерии – обязательных представителей нормальной кишечной микрофлоры организма во все периоды его жизни. Молочнокислые палочки (*L. acidophilus*) были выделены Моро в 1900 г. [6, 12].

С организмом животного ассоциированы, как правило, десятки и сотни видов различных микроорганизмов. Они являются облигатными для организма в целом. Многие виды микроорганизмов встречаются в разных областях тела, изменяясь лишь количественно. Количественные вариации микрофлоры возможны и в зависимости от вида млекопитающих.

Вся совокупность микроорганизмов и макроорганизм составляют своеобразный симбиоз, где каждый извлекает выгоды для своего существования и оказывает влияние на партнера. Функции кишечной микрофлоры по отношению к макроорганизму реализуются как локально, так и на системном уровне, при этом различные виды бактерий вносят свой вклад в это влияние.

Определение состава кишечного микробиоценоза позволяет практическим работникам судить о колонизационной резистентности кишечника животных – совокупности механизмов, предотвращающих заселение кишечника посторонними, в том числе и патогенными микроорганизмами, и стабилизирующих количественный и видовой состав микрофлоры пищеварительного тракта.

## 1. СОСТАВ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА

Желудочно-кишечный тракт животных заселяют разнообразные микроорганизмы. Вся микрофлора кишечника может быть разделена на облигатную (главная, автохтонная, индигенная, резидентная, постоянная – около 90% всех микроорганизмов), факультативную (условно-патогенные и сапрофитные микроорганизмы – 10%) и транзиторную (0,01%). В состав аутомикрофлоры периодически могут включаться и случайно проникающие в макроорганизм патогенные микроорганизмы.

Кроме микроорганизмов, в кишечнике обитают различные простейшие и более десяти видов кишечных вирусов. Все представители кишечной микробиоты находятся в постоянном взаимоотношении как друг с другом, так и с макроорганизмом, составляя в совокупности нормальный кишечный микробиоценоз – качественное и количественное соотношение разнообразных микробов, поддерживающих биохимическое, метаболическое и иммунное равновесие макроорганизма, необходимое для сохранения здоровья животных.

К резидентной микрофлоре желудочно-кишечного тракта относятся главным образом бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды, энтерококки, эшерихии, дрожжеподобные грибы. При этом большую ее часть (до 80-90%) у здоровых моногастричных животных, в том числе и у собак, составляют бифидобактерии. Второй по численности и по физиологической значимости группой зубиотической флоры желудочно-кишечного тракта животных являются молочнокислые бактерии, представители рода *Lactobacillus*.

Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы в течение жизни животного периодически контактируют и проникают в его организм, включаясь в состав общего комплекса микрофлоры. Для кишечника могут быть типичны *Ps. aeruginosa*, *Cl. perfringens*, *Candida albicans*, представители родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* и еще более патогенные энтеробактерии, а также *Bacteroides fragilis*, *Cl. tetani*, *Cl. sporogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, некоторые представители рода *Campylobacter*, кишечные спирохеты [1, 10, 14, 15, 17, 18, 19, 20].

С организмом животного ассоциированы, как правило, десятки и сотни видов различных микроорганизмов. Они являются облигатными для организма в целом. Многие виды микроорганизмов встречаются в разных областях тела, изменяясь лишь количественно. Количественные вариации микрофлоры возможны и в зависимости от вида млекопитающих. Большинству же животных свойственны общие усредненные показатели для ряда областей их тела [5, 11, 12]. Например, для дистальных, нижних отделов желудочно-кишечного тракта характерны следующие микробные группы, выявляемые в содержимом кишечника или фекалиях (таблица 1).

В настоящее время установлено, что на долю строго анаэробных видов в кишечнике приходится 95-99%, а все аэробные и факультативно анаэробные виды составляют оставшиеся 1-5%.

Несмотря на то, что в кишечнике обитают десятки и сотни (до 400) известных видов микроорганизмов, там могут существовать еще и совершенно неизвестные микроорганизмы. Так, в слепой и ободочной кишках некоторых грызунов в последние десятилетия было установлено наличие так называемых нитчатых сегментированных бактерий, которые очень тесно связаны с поверхностью (гликокаликсом, щеточной каймой) эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника. Утонченный конец этих длинных, нитевидных бактерий углублен между микроворсинками щеточной каймы эпителиальных клеток и, по-видимому,

фиксирован там так, что вдавливают мембраны клеток. Этих бактерий может быть так много, что они, подобно траве, покрывают поверхность слизистой оболочки. Это тоже строгие анаэробы (облигатные представители кишечной микрофлоры грызунов), полезные для организма виды, во многом нормализующие функции кишечника. Однако эти бактерии были обнаружены только бактериоскопическими методами (с помощью электронной сканирующей микроскопии срезов кишечной стенки). Нитчатые бактерии не растут на известных нам питательных средах, лишь могут переживать на плотных агаризованных средах не более одной недели.

**Таблица 1 – Микрофлора дистальных нижних отделов желудочно-кишечного тракта**

Название микробных групп (родов или видов)	Количество микробов в 1 г материала из кишечника
Бифидобактерии	$10^7 - 10^9$ (до $10^{10}$ )
Бактероиды	$10^{10}$ (до $10^{11}$ )
Пептококки	-
Пептострептококки	-
Копрококки	-
Фузобактерии	-
Эубактерии	-
Клостридии	$10^4 - 10^5$
Вайлонеллы	$10^4 - 10^5$
Анаэробные грамотрицательные кокки рода <i>Megasphaera</i>	-
Различные группы спирально извитых (изогнутые) бактерий; спирохеты	-
Лактобактерии	$10^5 - 10^7$
Эшерихии	$10^7$
Энтерококки	$10^5 - 10^7$
<b>Более транзиторно могут быть представлены:</b>	
Другие представители энтеробактерий ( <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> и др.)	$0 - 10^3$
Псевдомонады	$0 - 10^3$
Стафилококки (в т.ч. <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> )	$10^3 - 10^4$
Стрептококки ( <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> и др.)	до $10^7$
Дифтероиды	$0 - 10^4$
Аэробные бациллы (типа <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> )	$10^3 - 10^4$
Грибы, актиномицеты	$10^3$

Распределение микроорганизмов по отделам желудочно-кишечного тракта. В различных отделах кишечника микрофлора представлена различным коли-

чественным и видовым составом бактерий. Из-за высокой кислотности желудочного сока в желудке содержится небольшое количество микроорганизмов; в основном это кислотоустойчивая микрофлора – лактобактерии, стрептококки, дрожжи, сарцины и т.д. Количество микробов там –  $10^3$ /г содержимого.

В проксимальных участках тонкого отдела кишечника видов микрофлоры меньше, чем в толстом. Это лактобактерии, энтерококки, грибы, в более нижних отделах нарастает количество бифидобактерий, кишечных палочек. Количественно эта микрофлора может отличаться у разных особей. Возможна минимальная степень обсемененности ( $10^1$ - $10^3$ /г содержимого) и значительная –  $10^3$ - $10^4$ /г.

Однако правильно сложившаяся (отобранная в процессе эволюции) нормальная микрофлора организма животного в полном объеме населяет его тело не сразу, а за несколько дней, успевая размножиться в определенных соотношениях. В. Браун приводит следующую последовательность ее становления в первые три дня жизни новорожденного: бактерии обнаруживают в первых же пробах, взятых с тела новорожденного сразу после рождения. Так, в прямой кишке в 1-й день уже были обнаружены кишечные палочки, энтерококки, те же стафилококки, а к третьему дню после рождения устанавливался микробный биоценоз, в основном обычный для нормальной микрофлоры толстого отдела кишечника [12].

*Отличия микрофлоры тела разных видов животных.* Вышеприведенные облигатные представители микрофлоры свойственны большинству домашних, сельскохозяйственных млекопитающих и организму человека. В зависимости от вида животного скорее может меняться количество микробных групп, но не видовой их состав. У собак количество кишечных палочек и лактобактерий в толстом отделе кишечника такое же, как приведено в таблице 1. Однако бифидобактерии встречаются на порядок ниже ( $10^8$  в 1 г), на порядок выше – стрептококки (*Lactococcus lactis* (син. *Streptococcus lactis*), *Streptococcus mitis*, энтерококки) и клостридии. У крыс и мышей (лабораторных) настолько же увеличено количество молочнокислых палочек (лактобактерий), больше стрептококков и клостридий. У этих животных в кишечной микрофлоре мало кишечных палочек и уменьшено число бифидобактерий. Снижено количество кишечных палочек и у морских свинок (по данным В.И. Орловского). В фекалиях морских свинок, согласно нашим исследованиям, кишечные палочки содержатся в пределах  $10^3$ - $10^4$  в 1 г. У кроликов преобладают бактериоиды (до  $10^9$ - $10^{10}$  в 1 г), значительно уменьшено количество кишечных палочек (часто – даже до  $10^2$  в 1 г) и лактобактерий [12, 20].

Для микрофлоры рубца жвачных животных характерны специфические особенности. Во многом это связывают с наличием бактерий – расщепителей клетчатки. Однако целлюлолитические бактерии (и вообще фибролитические), характерные для пищеварительного тракта жвачных, не являются симбионтами одних лишь этих животных. Так, в слепой кишке свиней и многих травоядных животных важную роль играют такие общие со жвачными расщепители волокон целлюлозы и гемицеллюлозы, как *Fibrobacter succinogenes* (син. *Bacteroides succinogenes*), *Prevotella ruminicola* (син. *Bacteroides ruminicola*), *Ruminococcus flavefaciens* и другие.

Функции кишечной микрофлоры: защитная, пищеварительная, метаболическая и иммуномодулирующая [6].

*Защитная функция* кишечной микрофлоры проявляется в формировании колонизационной резистентности по отношению к потенциально болезнетворным микроорганизмам за счет образования бактериостатических низкомолекулярных метаболитов (КЦЖК, оксид азота, глутамат, гистамин, серотонин, мурамил дипептид и др.), деградации бактериальных токсинов, деконъюгации желчных кислот, продукции широкого спектра антимикробных веществ – бактериоцинов.

Известно, что кишечная палочка, продуцируя колицин, микроцин, оказыва-

ет бактерицидное действие на ряд патогенных возбудителей, таких как шигеллы, сальмонеллы, бациллы сибирской язвы и др. Лактобактерии способны проявлять ингибиторный эффект в отношении бацилл, клостридий, стрептококков, энтеробактерий, псевдомонад, листерий, кандид, образуя лактоцины, лактобревины, лактострепцины, низин, диплоцин и гелветицин. Бифидобактерии активно подавляют размножение гнилостных и гноеродных бактерий, продуцируя бифидин и бифилонг.

Одним из механизмов, регулирующих микробиоценоз, является блокада клеточных рецепторов – мест прикрепления патогенных микроорганизмов, а также достаточно жесткая конкуренция с условно-патогенными микроорганизмами за питательные субстраты. Низкомолекулярные метаболиты, такие как пропионовая кислота и пропионат, блокируя своими адгезинами рецепторы эпителиоцитов, предотвращают адгезию потенциально патогенных бактерий к эпителию. Одновременно с этим, нормальная аутофлора, вызывая стимулирующее антигенное раздражение слизистых оболочек кишечника, потенцирует созревание механизмов общего и локального иммунитета [6].

*Пищеварительная функция* включает в себя синтез микроорганизмами ферментов дисахаридаз, полисахаридаз и гликозидаз, расщепляющих некрахмальные полисахариды и пищевые волокна на мономеры, которые подвергаются ферментации; липаз, завершающих гидролиз жиров. Ключевую роль в процессах деполимеризации таких субстратов играют бактерии, принадлежащие к родам *Bacteroides* и *Bifidobacterium*. Деконъюгация желчных кислот микроорганизмами определяет гипохолестеринемический эффект микрофлоры. Дефицит бифидобактерий и активные гнилостные процессы в толстой кишке способствуют накоплению в организме холестерина. Бифидобактерии и в меньшей степени ацидофильные палочки выделяют ферменты деконъюгазы, которые переводят соли желчных кислот в труднорастворимые формы, акцептирующие в толстой кишке холестерин, который экскретируется с калом. При дефиците бифидобактерий и лактобактерий холестерин из толстой кишки всасывается в кровь, что сопровождается гиперхолестеринемией и гипертриглицеринемией, вследствие чего формируется гиперхолерез желчи и стеатоз печени.

*Метаболическая функция* нормальной микрофлоры состоит в синтезе эссенциальных нутриентов: витаминов группы В (тиамин, рибофлавин, пиридоксин, цианокобаламин, фолиевая, пантотеновая, никотиновая кислота), биотина, витамина К, таких важных для организма аминокислот, как аргинин и глутамин; в метаболизации гормонов и канцерогенных веществ, включая дигоксин сульфасалазины и эстрогены. Детоксицирующая способность индигенной микрофлоры кишечника вполне сопоставима с детоксицирующей функцией печени. Естественная аутофлора кишечника тормозит процессы декарбоксилирования пищевого гистидина, уменьшая тем самым синтез гистамина, а следовательно, снижает риск пищевой аллергии.

Микрофлора пищеварительного тракта участвует в обмене микро- и макроэлементов (Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, P, Cl и др.). Так такие микроорганизмы, как *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris et mirabilis*, *Citrobacter*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, могут аккумулировать на своей поверхности большое количество ионов кальция вплоть до образования кристаллов.

*Иммуномодулирующая функция* осуществляется как по отношению к неспецифическим факторам защиты, так и собственно адаптивному иммунному ответу. За счет микрофлоры происходит запуск и последующая активация синтеза неспецифических факторов защиты как гуморальных (лизозим, пропердин, комплемент), так и клеточных (фагоцитоз). Воздействие на иммунитет включает в себя стимуляцию созревания лимфоидного аппарата кишечника, активацию синтеза



sIgA и стимуляцию продукции цитокинов и интерферонов колоноцитами.

Кишечная микрофлора усиливает местный кишечный иммунологический барьер. Известно, что у стерильных животных в *lamina propria* определяется очень малое количество лимфоцитов, кроме того, у этих животных наблюдается иммунодефицит. Восстановление нормальной микрофлоры быстро приводит к увеличению количества лимфоцитов в слизистой оболочке кишечника и исчезновению иммунодефицита.

Резидентная флора, особенно некоторые микроорганизмы, обладают достаточно высокими иммуногенными свойствами, что стимулирует развитие лимфоидного аппарата кишечника и местный иммунитет (в первую очередь за счет усиления продукции ключевого звена системы местного иммунитета – секреторного IgA), а также приводит к системному повышению тонуса иммунной системы, с активацией клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Системная стимуляция иммунитета – одна из важнейших функций микрофлоры. Известно, что у безмикробных лабораторных животных не только подавлен иммунитет, но и происходит инволюция иммунокомпетентных органов. Поэтому при нарушениях микроэкологии кишечника, дефиците бифидофлоры и лактобацилл, беспрепятственном бактериальном заселении тонкой и толстой кишки возникают условия для снижения не только местной защиты, но и резистентности организма в целом.

Несмотря на достаточную иммуногенность, сапрофитные микроорганизмы не вызывают реакций иммунной системы. Возможно, это происходит потому, что сапрофитная микрофлора является своего рода хранилищем микробных плазмидных и хромосомных генов, обмениваясь генетическим материалом с клетками хозяина. Реализуются внутриклеточные взаимодействия путем эндоцитоза, фагоцитоза и пр. При внутриклеточных взаимодействиях достигается эффект обмена клеточным материалом. В результате представители микрофлоры приобретают рецепторы и другие антигены, присущие хозяину. Это делает их «своими» для иммунной системы макроорганизма. Эпителиальные ткани в результате такого обмена приобретают бактериальные антигены.

Обсуждается вопрос о ключевом участии микрофлоры в обеспечении противовирусной защиты хозяина. Благодаря феномену молекулярной мимикрии и наличию рецепторов, приобретенных от эпителия хозяина, микрофлора становится способной к перехвату и выведению вирусов, обладающих соответствующими лигандами.

С учетом того, что отечественные и зарубежные исследователи к строго облигатной микрофлоре желудочно-кишечного тракта животных относят микроорганизмы родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Candida* и др., нами основное внимание обращено на эти группы бактерий.

Определение патогенной микрофлоры проводится согласно действующим нормативным документам [17].

## 2. ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

### 2.1. Приготовление разведений фекалий животных

Для приготовления разведений фекалий животных рекомендуем использовать *метод последовательных (серийных) разведений* [13]. Для этого используют 10 пробирок со стерильным изотоническим раствором натрия хлорида, разлитым по 9 мл. Вначале готовят 10-кратные разведения фекалий в 10 пробирках. Если в пробирках налито по 9 мл физиологического раствора, то вносят в первую пробирку 1 г свежих фекалий, если налито по 4,5 мл физиологического раствора, то – 0,5 г свежих фекалий. В первую пробирку стерильной пипеткой вносят 1 мл исходной микробной взвеси свежих фекалий животных и получают разведение 1:10. После тщательного перемешивания другой стерильной пипеткой берут 1 мл из 1-й пробирки с разведением 1:10 и переносят во вторую пробирку, где получают разведение 1:100. Тщательно перемешивают и 1 мл из второй пробирки переносят в третью и т.д., включая десятую пробирку. Так делают последовательные десятичные разведения микробной взвеси фекалий, получая ряд пробирок с убывающей концентрацией микроорганизмов. Таким образом, получают разведения микробной взвеси фекалий от 1:10 до 1:10000000000, т.е.:

1-я пробирка – 1:10 <sup>1</sup>	6-я – 1:1000000 (10 <sup>6</sup> )
2-я – 3:100 (10 <sup>2</sup> )	7-я – 1:10000000 (10 <sup>7</sup> )
3-я – 1:1000 (10 <sup>3</sup> )	8-я – 1:100000000 (10 <sup>8</sup> )
4-я – 1:10000 (10 <sup>4</sup> )	9-я – 1:1000000000 (10 <sup>9</sup> )
5-я – 1:100000 (10 <sup>5</sup> )	10-я – 1:10000000000 (10 <sup>10</sup> )

Количество разведений зависит от предполагаемого содержания микроорганизмов в фекалиях. Для облегчения подсчета выросших колоний из соответствующего разведения фекалий следует выбирать таким образом, чтобы в чашках Петри выросло от 50 до 300 колоний.

### 2.2. Учет колониеобразующих единиц (КОЕ)

Поскольку каждая микробная клетка образует одну колонию, подсчитывают их количество в чашках с посевом разведенных фекалий и последовательно умножают на число разведений и при необходимости на количество посевного материала. Данные записывают в соответствующие графы таблицы 2. Получив данные по всем 7 чашкам (от № 4 до № 10), определяют среднее микробное число. Пример расчета указан в приложении к таблице 2.

**Таблица 2 – Количество колониеобразующих единиц (КОЕ)**

Показатели	Номер чашки / разведения фекалий в пробирках									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>
Количество выросших колоний	-	-	-	302	200	150	140	120	100	50
Микробное число в конкретном разведении	-	-	-	302 × 10 <sup>4</sup>	200 × 10 <sup>5</sup>	130 × 10 <sup>6</sup>	140 × 10 <sup>7</sup>	120 × 10 <sup>8</sup>	100 × 10 <sup>9</sup>	50 × 10 <sup>10</sup>
Среднеарифметическое микробное число				Все показатели сложить и разделить на 7 (по числу чашек)						

*Примечание 1.* Форму таблицы 2 можно использовать для фиксирования результатов при подсчете различных видов микроорганизмов – кишечных палочек, бацилл, лакто- и бифидобактерий, а также любого количества опытных животных.

*Примечание 2.* Пример расчета КОЕ.

Например, *Действие 1.* В чашке № 4 –  $302 \times 10^4 = 3020000$  КОЕ

в чашке № 5 –  $200 \times 10^5 = 20000000$  КОЕ

в чашке № 6 –  $150 \times 10^6 = 150000000$  КОЕ

в чашке № 7 –  $140 \times 10^7 = 1400000000$  КОЕ

в чашке № 8 –  $120 \times 10^8 = 12000000000$  КОЕ

в чашке № 9 –  $100 \times 10^9 = 100000000000$  КОЕ

в чашке № 10 –  $50 \times 10^{10} = 500000000000$  КОЕ

---

При сложении получаем результат: 613573020000 КОЕ

*Действие 2.* Расчет среднеарифметического числа КОЕ. 613573020000 разделить на 7 (количество подсчитанных чашек) = 87653288571 КОЕ (среднеарифметическое число – количество колоний (КОЕ) микроорганизмов в 1 мл микробной взвеси). Таким образом, в 1 мл разведенных фекалий животных обнаружено 87653288571 колоний микроорганизмов ( $8,8 \times 10^{10}$  КОЕ).

*Примечание 3.* Иногда для удобства подсчета, в зависимости от микробной обсемененности, считают не 7 чашек, а последние 2-3 чашки и выводят среднее арифметическое число.

*Примечание 4.* При использовании стеклянных чашек Петри перед опытом их тщательно моют, монтажируют бумагой и стерилизуют в автоклаве при  $t$  120-130°C, Д – 1,2 атм в течение 60 мин. При использовании одноразовых пластмассовых чашек Петри необходимо их помыть, простерилизовать 3%-ным раствором перекиси водорода в течение 5 мин и просушить (чашками вверх) под бактерицидными лампами в течение 5 мин.

### **3. ЭТАПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖИВОТНЫХ**

Видовой состав и количественные соотношения микроорганизмов в норме относительно стабильны и характеризуют микробиологический статус организма, называемый также зубиозом. Однако уменьшение числа облигатной микрофлоры, обладающей высокой антагонистической активностью, создает условия для развития тех родов и видов энтеробактерий и других микроорганизмов, размножение которых в нормальных условиях было подавлено конкуренцией активных симбионтов, либо тех бактерий, которые оказались транзиторно в кишечнике. Качественное и количественное содержание микробов желудочно-кишечного тракта может варьировать в соответствии с характером питания, возрастом, полом, воздействием факторов внешней среды [4].

В зависимости от предполагаемой микробной обсемененности (с учетом таблицы 1) из 5-7 пробирок с приготовленными разведениями фекалий делают посева с использованием питательных сред, используемых для выделения той или иной группы бактерий:

- при посеве материала на агаризованные питательные среды по 0,1 или 0,2 см<sup>3</sup> взвеси фекалий вносят на поверхность с плотной питательной средой в чашках Петри и тщательно растирают шпателем;

- при посеве материала в полужидкие и плотные среды, разлитые в пробир-

ки высоким столбиком или чашки Петри, вносят 1 мл взвеси на 9 мл среды.

Все посеы инкубируют при  $t\ 37^{\circ}\text{C}$  24-48 ч, чашки со средой Сабуро оставляют после этого еще на двое суток при комнатной температуре 18-24 $^{\circ}\text{C}$ . Анаэробов культивируют в анаэробных условиях, с использованием анаэростатов, анаэробных камер, эксикаторов. Можно использовать разовые коммерческие пакеты и генераторы. Посевы инкубируют не менее двух суток. Для удаления воздуха из вакуумных приборов предпочтительно использовать вакуумные насосы или газогенерирующие пакеты.

*Примечание.* Переносят в пробирки при проведении разведений не надосадочную жидкость, а перемешанные разведения взвеси фекалий.

### 3.1. Определение общего количества кишечных палочек

*Общие сведения.* Энтеробактерии (от греч. *entero* – кишечник) своим названием обязаны тому, что большинство их видов является постоянным обитателем кишечного тракта позвоночных. Среди них имеются патогенные, условно-патогенные и сапрофиты. Патогенные и условно-патогенные энтеробактерии могут вызывать у животных и человека болезни, различающиеся по клиническим признакам и формам течения.

Энтеробактерий относят (Bergey, Second Edition, Vol. 2, 2005) к домену *Bacteria*, типу *Proteobacteria*, классу *Gamma**proteobacteria*, порядку *Enterobacteriales*, семейству *Enterobacteriaceae*, включающему 43 рода (Bergey, Second Edition, Vol. 2, 2005) [7, 21].

За период, прошедший после выхода в 2008 году второго издания данного руководства, состав семейства *Enterobacteriaceae* существенно расширился. По состоянию на 01.06.2011 года семейство *Enterobacteriaceae* включает 47 родов: *Arsenophonus*, *Biostraticola*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Cedecea*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Gibbsiella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluuyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Mangrovibacter*, *Moellerella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Saccharobacter*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Shimwellia*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Thorsellia*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, *Yokenella*.

Семейство *Enterobacteriaceae* – это грамотрицательные тонкие палочки шириной 0,3-1,0 мкм и длиной от 0,6-1,0 до 3-6 мкм, подвижные перитрихи (кроме *Tatumella*) или неподвижные бактерии. Они не образуют эндоспор или микроцист, не кислотоустойчивы, капсул не формируют, за исключением отдельных сероваров. Растут в присутствии кислорода или без него. Хорошо развиваются в пептонных и мясных средах, обычно на среде Эндо, Плоскирева, Левина, Мак-Конки, Конго-рот-агаре и др.

Представители семейства каталазоположительны, за исключением *Shigella dysenteriae* серовара 1 и *Xenorhabdus nematophila*, оксидазонегативны (за исключением бактерий вида *Plesiomonas shigelloides*, которые продуцируют оксидазу). Нитраты редуцируют в нитриты, за исключением некоторых штаммов *Erwinia* и *Yersinia*. Ферментативные реакции положены в основу дифференциации энтеробактерий на роды, виды и подвиды.

Качественные изменения состава микробного пейзажа в кишечнике при дисбактериозе выражаются в изменении ряда свойств кишечной палочки – основного симбионта аэробной микрофлоры. Ферментативные свойства эшерихий: образуют индол, дают отрицательную реакцию Фогеса-Проскауэра и положительную с метилротом; не расщепляют мочевины и обычно не утилизируют цитрат аммония. Не разжижают желатин. Способность расщеплять лактозу – хорошо из-

вестное свойство *E. coli*, однако встречаются штаммы, не ферментирующие ее. Одним из характерных признаков является снижение ее антагонистических свойств. Кишечная палочка часто утрачивает ферментативную активность и подвижность. Гемолизирующие эшерихии, выделенные от животных с дисбактериозом кишечника, обладают, как правило, токсическими свойствами.

Условно-патогенные микроорганизмы семейства кишечных не являются элементами облигатной микрофлоры, вместе с тем они обнаруживаются и у здоровых животных. Условно-патогенные микроорганизмы становятся возбудителями смешанной кишечной инфекции молодняка животных лишь при определенных условиях, снижающих резистентность микроорганизма. К ним относятся *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* и др. Все перечисленные представители семейства *Enterobacteriaceae* являются грамотрицательными, аэробными, подвижными или неподвижными палочками. Растут на обычных питательных средах, расщепляют глюкозу с образованием или без образования газа и редуцируют нитриты из нитратов. В здоровом кишечнике вышеперечисленные представители семейства *Enterobacteriaceae* встречаются непостоянно и в небольших количествах.

При оценке результатов бактериологического исследования в первую очередь необходимо обращать внимание на наличие в посевах фекалий патогенных энтеробактерий: сальмонелл и энтеропатогенных кишечных палочек.

Идентификацию патогенных и условно-патогенных энтеробактерий проводят в соответствии с Методическими указаниями по лабораторной диагностике ассоциированной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями, утвержденными ГУВ МСХ и П РБ 17.12.2007, № 10-2-5/1107 [17].

На среде Плоскирева (или аналоге) отбирают колонии, подозрительные на патогенные или условно-патогенные энтеробактерии: нежные, прозрачные, бесцветные с ровными или неровными краями. Отобранные однотипные колонии засевают на среду Клиглера (скошенный столбик) для получения чистой культуры и идентификации.

На среде Эндо с 2,5% крови (или аналоге) подсчитывают общее количество колоний и число лактозонегативных (бесцветных) и гемолизирующих колоний. Затем рассчитывают количество кишечных палочек в 1 г фекалий, для чего количество колоний умножают на 10 (так как для посева берут 0,1 мл материала), на 100, на 1000 в соответствии с взятым на исследование разведением культуры. Например: при посеве 0,1 мл из 6-го разведения фекалий на чашке выросло 40 колоний, из них 20 лактозонегативных и 10 гемолизирующих, следовательно, в 1 г испражнений содержится  $4 \times 10^8$  КОЕ кишечной палочки, из них лактозонегативных –  $2 \times 10^8$ , гемолизирующих –  $1 \times 10^8$ . Окончательный результат количественного содержания бактерий в 1 г фекалий выражается как среднее арифметическое из всего количества колоний, подлежащих учету. Для этого сумму колоний, выросших на всех чашках, делят на количество исследуемых чашек, учитывая степень разведения.

На Конго-рот-агаре дифференцируют (по лактозному признаку) патогенные энтеробактерии от непатогенных или условно-патогенных. Лактозоположительная кишечная палочка формирует на этой среде колонии серого цвета; лактозоотрицательная кишечная палочка – бледно-розовые мутноватые с ровными краями. Клебсиеллы растут в виде крупных выпуклых колоний желтого цвета. Лактозоотрицательные микроорганизмы (шигеллы, сальмонеллы, протей) формируют красные прозрачные колонии в тон среды. Их дальнейшая идентификация осуществляется с помощью общепринятых подтверждающих тестов. Кроме того, среда обеспечивает рост и дифференциацию грамположительной кокковой флоры. Ста-

филококки образуют круглые непрозрачные колонии оранжевого цвета с черным центром или без него. Стрепто-, энтерококки – мелкие от точечных до 1,0 мм в диаметре. При этом в процессе культивирования происходит изменение цвета среды вокруг колоний: от красного – в черный [4].

Селективный рост бактерий родов *Proteus-Providencia* учитывают также на амфолан-агаре. Преимущество этой среды – выделение в чистой культуре всех бактерий родов протея, провиденции, морганеллы и отсутствие роста у «роящихся» его видов. Количество микроорганизмов характеризуют разведением материала, который дал рост.

Вначале делают последовательные 10-кратные разведения свежих фекалий в пробирках. Затем для определения количества кишечных палочек в содержимом фекалий рекомендуем использовать метод поверхностного посева, для чего 10-кратные разведения фекалий (по 0,1 или 0,2 см<sup>3</sup> микробной взвеси 10-кратных разведений фекалий) из пробирок от № 4 (разведение 10<sup>4</sup>) до № 10 (разведение 10<sup>10</sup>) вносят стерильной пипеткой на поверхность подсушенного агара Эндо в чашках Петри и тщательно распределяют шпателем. Пробирки и чашки Петри соответственно нумеруют от 1 до 10.

*Примечание 1.* На каждую чашку Петри необходимо брать отдельную стерильную пипетку. Если пипетка одна, то посев в чашки необходимо делать с последней к первой, т.е. справа налево, либо использовать отдельный стерильный наконечник.

Осторожно приподняв крышку чашку Петри левой рукой, правой рукой тщательно растирают посевной материал стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности питательной среды до полного втирания жидкости (посев «сплошным газоном»).

*Примечание 2.* Шпатель можно приготовить на пламени спиртовки из пастеровской пипетки. После распределения посевного материала тонкий конец пастеровской пипетки обламывают, избыток жидкости отсасывают этой же пастеровской пипеткой и помещают в банку с дезинфицирующим раствором. Можно использовать 1 шпатель или пастеровскую пипетку для распределения посевного материала от 10-й чашки к 4-й, т.е. справа налево.

Засеянные чашки Петри с агаром Эндо переворачивают вверх дном, заворачивают в бумагу, подписывают номер экспертизы и помещают в термостат при температуре 37°C на 24-48 часов, после чего производят учет результатов исследования.

*Примечание 3.* Чашки переворачивают вверх дном для того, чтобы избежать попадания конденсационной воды на поверхность посевов и получить отдельные изолированные колонии микроорганизмов.

*Примечание 4.* Культивирование можно проводить при t 40-42°C (диапазон роста *E. coli*), так как в таком случае ингибируется рост других микроорганизмов и энтеробактерий.

После инкубации в термостате подсчитывают количество выросших колоний на поверхности питательной среды. При появлении на среде Эндо красных с металлическим блеском колоний, свидетельствующих о росте кишечных палочек, их изучают выборочно. Из этих колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. По наличию в мазке грамотрицательных микроорганизмов палочковидных форм размером 1-4 мкм можно предварительно судить о чистоте культуры кишечных палочек. Можно дополнительно поставить биохимический тест, проведя посев культуры кишечной палочки на глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу и маннит, а также провести идентификацию культуры *E. coli* с использованием монорецепторных эшерихиозных сывороток. Подсчет колоний осуществляют с помощью лупы, помещая чашку на уровне глаз и покачивая ею справа

налево. При небольшой обсемененности (до 100 колоний) подсчитывают в чашке все колонии, а при большом количестве – не менее 1/3 площади дна чашки. В таком случае дно чашки делят восковым карандашом на 3 сектора и ведут подсчет КОЕ в одном секторе и полученный результат умножают на 3. Для облегчения подсчета колоний в случае, когда колоний вырастает более 150, дно чашки расчерчивают восковым карандашом на 4 сектора и подсчитывают либо только половину, умножая показатель на 2, либо подсчитывают в одном из 4 секторов с последующим умножением числа колоний на 4. Записи делают согласно данным таблицы 1.

### 3.2. Определение общего количества лакто- и бифидобактерий

*Общие сведения.* Лактобактерии относят (Bergey, Second Edition, Vol. 3, 2009) к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*, включающему 96 видов. Вопросы номенклатуры и таксономии бактерий данного рода до настоящего времени окончательно не решены и подвержены пересмотру. В настоящее время род объединяет более 150 видов и представляет самую большую группу в порядке *Lactobacillales* [3].

Внутри рода *Lactobacillus* встречаются бактерии с различной морфологией. Большинство представителей рода имеют форму прямых палочек с закругленными концами, собранных в цепочки различной длины, либо расположенные одиночно или попарно (рисунки 1, 2). Среди лактобацилл встречаются короткие кокковидные и извитые формы, а также длинные, нитевидные палочки длиной от 0,5-1,2 до 1-10 мкм, расположенные единично или собранные в цепочки. Так, изогнутая форма клеток присуща *L. curvatus*; у *L. coryniformis* клетки имеют форму изогнутых грушевидных палочек. Длина палочек и величина изгиба обычно зависят от условий роста: состава питательной среды, температурного режима, аэрации, а также возраста культуры. У некоторых видов (например, *L. fermentum*, *L. brevis*) культура всегда представлена смесью коротких и длинных палочек.

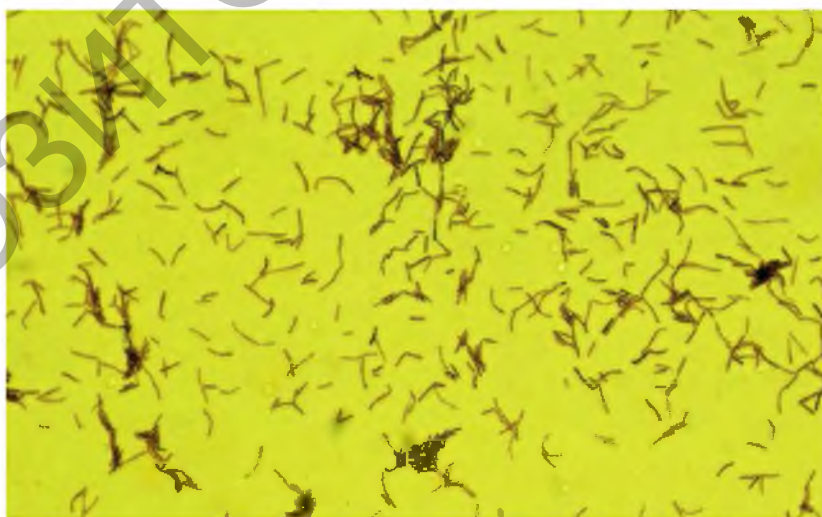
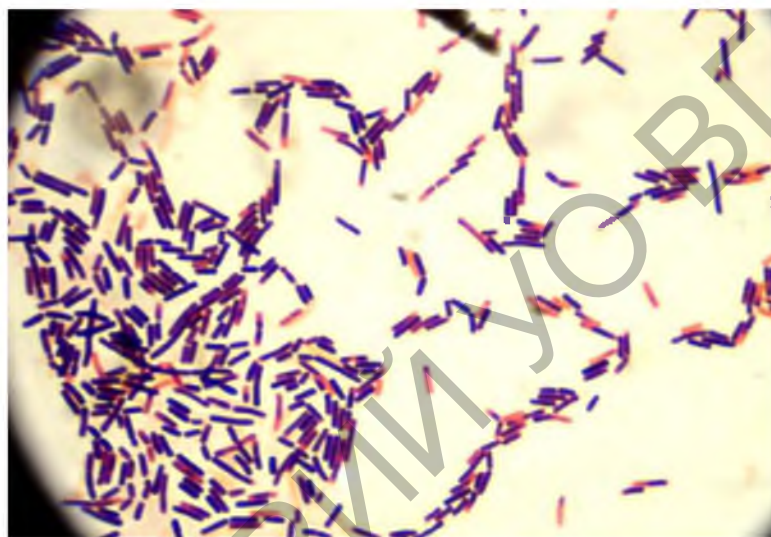


Рисунок 1 – Мазок из чистой культуры *Lactobacillus acidophilus*.  
Окраска по Граму. Источник : <http://www.gutspace.com/lactobacillus-acidophilus>

Лактобациллы не образуют эндоспор. По Граму окрашиваются положительно, становятся грамотрецитательными с возрастом и при повышении кислотности (рисунок 2). При окраске по Граму или метиленовым синим у некоторых

штаммов выявляются биполярные тельца, зернистость или линейная исчерченность цитоплазмы. Для некоторых видов, например, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *L. delbrueckii subsp. lactis*, характерно наличие включений зерен волютина (метахроматина, полифосфатных гранул). Большинство лактобацилл неподвижны. Подвижность наблюдается лишь у представителей некоторых видов (а именно: *L. agilis*, *L. aquaticus*, *L. capillatus*, *L. ghanensis*, *L. mali*, *L. nagelii*, *L. oeni*, *L. ruminis*, *L. satsumensis*, *L. sucicola*, *L. uvarum*, *L. vini*), при этом они передвигаются с помощью перитрихальных жгутиков. Интересно отметить, что перемещаться могут не только отдельные клетки, но и цепочки из 2-5 клеток. Подвижность в значительной степени зависит от питательной среды и возраста культуры; часто она обнаруживается только при выделении лактобацилл и утрачивается после нескольких пересевов.



**Рисунок 2 – Мазок из чистой культуры *Lactobacillus spp.* Окраска по Граму**

Источник : <http://svet-biologije.com/biologija/mikrobiologija/bakterije/klasifikacija-bakterija/gram-pozitivni-stapici/>

Многие лактобациллы образуют экзополисахариды (*extracellular polysaccharides, EPS*), которые бывают двух видов – внеклеточные гомополисахариды (чаще всего – декстран, глюкан, леван, синтез которых индуцируется добавлением сахарозы в среду) и внеклеточные гетерополисахариды (синтезируются в небольших количествах (0,1-1,5 г/л) из нуклеотид-активируемых предшественников). Иногда EPS лактобацилл представлены капсулой. Так, капсула диаметром 1,5-3 мкм обнаружена у бактерий *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, выделенных из йогурта и *L. kefiranofaciens*, выделенных из кефирного зерна. Благодаря способности образовывать EPS *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* применяются в производстве йогурта, они обеспечивают необходимую текстуру этого пищевого продукта. EPS *L. kefiranofaciens* образуют матрикс, называемый «кефирным зерном», который служит экологической нишей для микробного сообщества дрожжей и лактобацилл.

Лактобактерии – факультативные анаэробы, иногда – микроаэрофилы. Хотя большинство штаммов аэротолерантны, оптимальными для роста являются анаэробные и микроаэрофильные условия. Лактобациллы обычно слабо растут на воздухе, лучше – при пониженном содержании кислорода. Повышенная концентрация углекислого газа ( $\approx 5\%$ ) может стимулировать рост; в строго аэробных условиях, как правило, рост замедляется. Некоторые виды являются строгими анаэробами.



Почти все лактобациллы – мезофилы. Температурный оптимум развития лежит в пределах  $t$  30-40°C, pH – 5,5-5,8. Верхней температурной границей (максимумом) для них является  $t$  40°C, однако встречаются термофильные виды, которые хорошо растут и имеют активный метаболизм при температуре около 45°C. Психрофильные виды также встречаются. Температурный диапазон роста  $t$  2-53°C.

Бактерии требовательны к составу питательных сред и нуждаются во внесении в них аминокислот, витаминов, жирных кислот, углеводов и производных нуклеиновых кислот (индивидуальные для каждого вида). Для культивирования лактобактерий предложены следующие среды : бульон и агар MRS для лактобактерий, агар для молочнокислых бактерий (*Lactic Agar*), бульон и агар SL для лактобактерий (по Рогозе), среда Рогоза, питательная среда для культивирования лактобацилл с этанолом, молочная питательная среда для культивирования лактобацилл, капустный агар, среда для выделения молочнокислых бактерий (по Нетрусову А.И.), глюкозо-пептонный агар (ГПА), жидкая и плотная среда Лоурия-Бертони (LB), томатный агар, агар SL с желчью для лактобактерий, селективный агар для лактобактерий (*Lactobacillus Selection Agar Base*) и др.

На плотных питательных средах лактобациллы формируют колонии сферические, часто чечевицеобразные, гладкие, непрозрачные, иногда блестящие, выпуклые, с ровными четкими контурами (рисунок 3). Обычно колонии мелкие, но у некоторых видов их размер может превышать 4 мм в диаметре. Колонии как правило не пигментированные, белые или слегка кремового цвета, иногда – желтоватые или красноватые. Некоторые виды образуют шероховатые (rough) колонии. На средах с белками или липидами зон просветления вокруг колоний обычно не образуется. Тем не менее, большинство лактобацилл обладают слабой протеолитической активностью (за счет секретируемых и связанных с клеточной стенкой протеаз и пептидаз) и слабой липолитической активностью (благодаря внутриклеточным липазам). Амилолитическая активность на агаризованных средах с крахмалом обнаруживается только у некоторых видов: *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. fermentum*. Отдельные виды лактобацилл (*L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. casei*) способны образовывать внеклеточные нуклеазы при выращивании на агаре, содержащем ДНК или РНК.

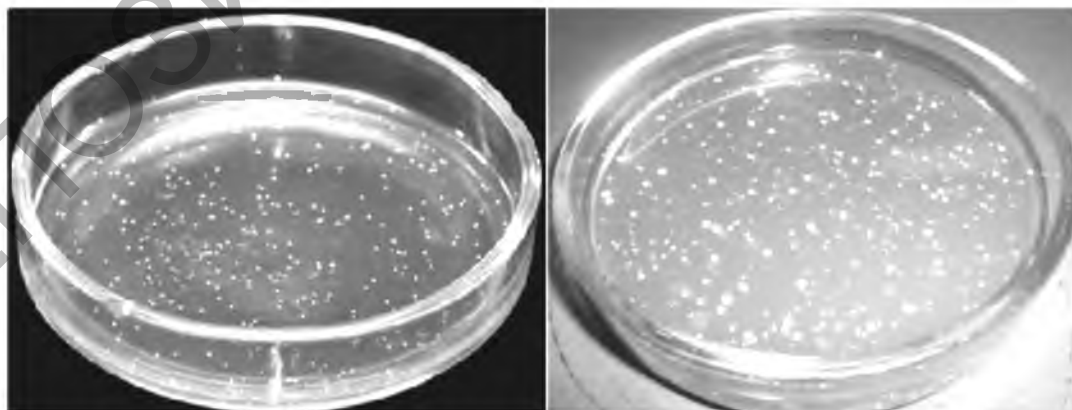


Рисунок 3 – Колонии *L. plantarum* на агаризованной среде MRS (по Яруллиной Д. Р., Фахруллину Р. Ф., 2014)

Для выделения лактобактерий чаще всего используют агаризованные среды MRS (*Difco*, *Oxoid*). При количественном методе исследования посев проводят из разведений  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$ . Для того чтобы избежать роста дрожжепо-

добных грибов рода *Candida*, в среду добавляют раствор сорбиновой кислоты в 1 М NaOH из расчета 14 г/л, простерилизованную фильтрованием. Инкубацию проводят в анаэробном состоянии или эксикаторе, удалив воздух физическим или химическим способом, при  $t +37^{\circ}\text{C}$  в течение 48 часов.

Колонии лактобактерий на MRS агаре могут быть мелкими, гладкими или зернистыми, плоскими или слегка выпуклыми, бесцветными или слабо пигментированными, диаметром 1-3 мм. При глубинном посеве колонии могут быть в форме «птичек», «лодочек».

Лактобактерии на агаре (лактобакагар, среда Рогоза) образуют мелкие нежные колонии с гладкими или изрезанными краями («паучкообразные»). На среде МРС-4 – гладкие белые, выпуклые, средние по величине колонии; могут быть и более крупные, шероховатые, молочно-белые. О количестве лактобактерий судят по числу характерных колоний, которые подвергают микроскопии и дальнейшей идентификации.

При глубинном посеве на твердую питательную среду образуются плотные колонии в виде правильных линз (чечевицеобразные), треугольной и неправильной формы или нежные, напоминающие снежинку или комочек ваты. Если в среду был добавлен мел, то вокруг колоний вследствие накопления молочной кислоты образуется зона растворения мела.

Хороший рост наблюдается в полужидкой питательной среде, содержащей 0,15-0,75% агара. Небольшие концентрации агара обеспечивают низкий окислительно-восстановительный потенциал среды и создают благоприятные микроаэрофильные условия. По характеру роста в полужидкой среде выделяют пять вариантов: рост шариками, в виде продольной полосатости, придонный, поверхностный, равномерное помутнение среды.

При росте на жидких питательных средах лактобациллы чаще всего вызывают равномерное помутнение, вскоре после прекращения роста осаждаются в виде ровного гомогенного, реже хлопьевидного осадка, никогда не образуя пленок на поверхности среды.

Видовую принадлежность определяют по биохимическим свойствам и способности расти при разных температурах. Лактобациллы чрезвычайно разнообразны по своим биохимическим и физиологическим свойствам. Лактобактерии расщепляют углеводы; при сбраживании глюкозы pH снижается на одну единицу и более; не менее половины конечных углеводных метаболитов составляет лактат.

Из углеводов они преимущественно сбраживают гексозы (глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу) и дисахариды (лактозу, мальтозу, сахарозу), и только гетероферментативные виды, например, некоторые штаммы *L. plantarum*, сбраживают пентозы (рибозу, ксилозу, арабинозу). Лактоза – дисахарид, поэтому прежде чем вступить на путь катаболизма, она должна быть расщеплена ферментом галактозидазой до глюкозы и галактозы. Галактоза затем фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата.

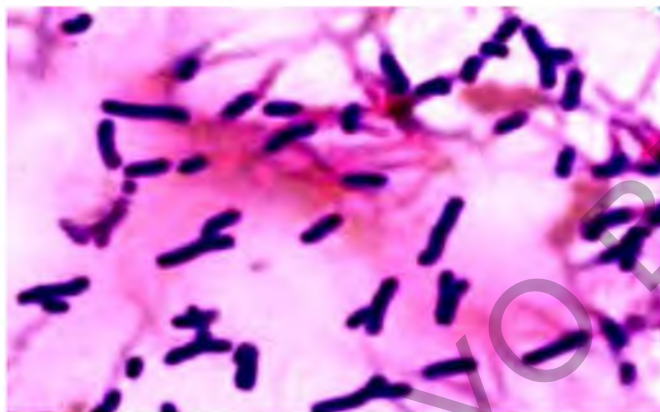
Нитраты не восстанавливают, желатин не разжижают, казеин не расщепляют, индол и  $\text{H}_2\text{S}$  не образуют, каталазо-отрицательные.

Физиологической особенностью лактобактерий является их кислотоустойчивость. Для роста лактобацилл наиболее благоприятны слегка подкисленные среды с начальным pH 5,4-6,4, причем рост культуры замедляется при достижении pH 3,6-4,0 в зависимости от вида и штамма. *L. suebicus*, *L. casei* и *L. plantarum* сохраняют способность к росту даже при pH 2,8. В щелочных и нейтральных средах рост лактобацилл как правило замедляется. Еще одна отличительная особенность данной группы микроорганизмов – это их спиртоустойчивость. Они способны развиваться в питательных субстратах при высо-

ких концентрациях этилового спирта (18-24% об.).

Бифидобактерий относят к классу *Actinobacteria*, порядку *Bifidobacteriales*, семейству *Bifidobacteriaceae*, роду *Bifidobacterium*, включающему 32 вида.

Бифидобактерии – грамположительные полиморфные палочки размером 0,5-1,3 x 1,5-8 мкм. Палочки бифидобактерий могут быть утолщенными на концах или ветвиться. В мазках они располагаются одиночно, парно, в виде палисада или X, Y и V-образной формы, нередко с утолщением на концах, что делает их похожими на дифтероиды. Неподвижны, спор и капсул не образуют (рисунок 4).



**Рисунок 4 – Мазок из чистой культуры *B. bifidum*. Окраска по Граму**

Источник: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/436.html>

Все виды бифидобактерий при первичном выделении являются строгими анаэробами. В присутствии углекислого газа они могут быть толерантными к кислороду. При лабораторном культивировании эти микроорганизмы приобретают способность развиваться в присутствии некоторого количества кислорода, а в высокопитательных средах - расти в полностью аэробных условиях. Чувствительность к кислороду у многих штаммов бифидобактерий варьирует, что обусловлено различиями в механизме брожения. Некоторые виды могут расти в атмосфере воздуха, обогащенного 10% CO<sub>2</sub>. Оптимальной является температура 37-41°C. Оптимальное значение pH 6-7, при pH ниже 4,5 и выше 8,5 рост микроорганизмов прекращается.

Бифидобактерии культивируют, создавая анаэробные условия или снижая окислительно-восстановительный потенциал среды, на молоке, гидролизованном молоке и гидролизате казеина, а также на печеночном бульоне с добавлением ростовых веществ (дрожжевого автолизата, кукурузного экстракта, цистеина и др.). На плотных питательных средах бифидобактерии образуют разнообразные колонии: плоские, полушаровидные, блестящие, шероховатые, окруженные валиком, имеющие более темный центр и т.д. Цвет колоний изменяется от белого и серого до темно-коричневого. Колонии часто напоминают по форме зерно гречихи или усеченную треугольную пирамиду, на некоторых средах колонии имеют форму чечевичек. Размеры колоний – от 0,5 до 5 мм.

На высоком столбике среды Блаурокка встречаются колонии чечевицеобразные, ромбовидные и бесформенные шероховатые («кочочок ваты»), чаще – белого цвета. На кровяном агаре вырастают как резко выпуклые, гладкие, так и уплощенные колонии от беспигментного до светло- и темно-коричневого цвета.

Бифидобактерии ферментируют с образованием кислот (преимущественно уксусной и молочной) глюкозу, лактозу, сахарозу и маннит. Они синтезируют фермент фруктозо-6-фосфатфосфокетотазу (Фб-ФФК), не образуют индол и ката-

лазу, не восстанавливают нитраты, не сбраживают адонит (рубит), дульцит, эритрит, глицерин, рамнозу и альфа-метил-D-маннозид.

*а) определение количества лакто- и бифидобактерий на полужидкой тиогликолевой среде с содержанием 0,25-0,3% агара;*

Лакто- и бифидобактерии являются строгими анаэробами, т.е. растут без доступа кислорода воздуха, поэтому для их выявления используют полужидкую с содержанием 0,25-0,3% агара тиогликолевую среду. Для ее приготовления используют следующие ингредиенты (в г):

Панкреатический гидролизат казеина – 15; витаминный препарат «ЖД» – 5; натрий хлористый – 2,5; Д-глюкоза – 5,0; тиогликолят натрия – 0,5; цистеин дигидрохлорид – 0,75; агар микробиологический – 0,75 (можно использовать голодный стебельчатый или агар Дифко, который используют для постановки РИД); натрий углекислый – 1,0; рН  $7,2 \pm 0,2$ .

Способ приготовления питательной среды

Для приготовления полужидкой тиогликолевой среды с содержанием 0,3% агара берут 30 г сухого порошка тиогликолевой среды, 2,5-3,0 г агара голодного (а не МПА!) и растворяют в 1 л дистиллированной воды, кипятят в течение 2 минут, фильтруют через полотно типа «Бельтинг» или бумажный фильтр, разливают по 10 мл (после остывания в пробирках будет по 9 мл среды) в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C (1,5 атм) в течение 30 мин [12].

*Примечание 1.* В связи с тем, что лакто- и бифидобактерии – строгие анаэробы, то тиогликолевую среду прогревают до  $t 70^{\circ}\text{C}$  перед непосредственным использованием, чтобы вышел весь кислород, и охлаждают перед посевом до  $t 43-45^{\circ}\text{C}$ . Горячую среду прямо из автоклава использовать не рекомендуется!

При выделении лакто- и бифидобактерий с целью получения их чистой культуры рекомендуем применить метод Коха. Вначале готовят разведение фекалий: в первую пробирку с 1 г свежих фекалий (т.е. 1 мл исходной микробной взвеси) добавляют 9 мл физраствора, перемешивают и получают разведение 1:10. Используют 9 пробирок с полужидкой тиогликолевой средой, пробирки должны быть заранее пронумерованы. Затем готовят разведение фекалий в расплавленной и остуженной до  $t 43-45^{\circ}\text{C}$  полужидкой 0,3% тиогликолевой среде в пробирках, налитых столбиком по 10 мл (после автоклавирования и остывания в пробирках будет по 9 мл). В процессе разведения пробирки во избежание застывания среды (не ниже  $43^{\circ}\text{C}$ ), ее зажимают в кулаке. Разведения фекалий в полужидкой среде делают от  $10^2$  до  $10^{10}$ , используя вышеуказанный метод последовательных разведений.

При последовательных разведениях фекалий из пробирки в пробирку с тиогликолевой средой вносят по 1 мл расплавленной среды с разведенными фекалиями, при этом быстро и тщательно пробирки перемешивают круговыми движениями в ладонях рук.

*Примечание 2.* 1 г свежих фекалий (т.е. 1 мл исходной микробной взвеси) вначале разводят только в 1-й пробирке с 9 мл физраствора, а затем продолжают делать разведения от 2-й до 10-й пробирок только в расплавленной и остуженной до  $t 43-45^{\circ}\text{C}$  полужидкой с содержанием 0,2-0,3% агара тиогликолевой среде.

*Примечание 3.* Можно делать разведение микробной взвеси методом последовательных десятикратных разведений в физрастворе в пробирках от № 1 до № 10, но затем вливать по 1 мл микробной взвеси на физрастворе в пробирки с 9 мл расплавленной до  $t 43-45^{\circ}\text{C}$  полужидкой тиогликолевой средой соответственно в заранее пронумерованные пробирки. Например, из 4-й пробирки в 4-ю, из 5-й в 5-

ю и т.д. до 10-й пробирки, но в таком случае обязательно на каждое разведение использовать отдельную пипетку. Также при подсчете колоний в выросшей тиогликолевой среде учесть, что разведения микробной взвеси при добавлении в среду вновь десятикратно разводились, в связи с чем необходимо этот факт учесть при перерасчете.

Например, из 4-ой пробирки, где разведение на физрастворе соответствовало  $10^4$ , было добавлено 1 мл в пробирку с 9 мл тиогликолевой среды, таким образом, разведение стало в этой четвертой пробирке не  $10^4$ , а  $10^5$ .

Через 2-3-е суток культивирования при  $t\ 37^\circ\text{C}$  в термостате в толще агара в пробирках, где концентрация микробов наименьшая, вырастают изолированные колонии. Далее ведут подсчет колоний так, как указывалось при подсчете кишечных палочек и бацилл. Следует отметить, что в толще тиогликолевой полужидкой среды лакто- и бифидобактерии, являющиеся анаэробами, растут до тех пор, пока им хватает растворенного в толще среды молекулярного кислорода, но затем рост их приостанавливается, поэтому обнаруживают колонии очень мелкие.

Необходимо отметить, что для культивирования лакто- и бифидобактерий, являющихся анаэробами, в тиогликолевой полужидкой среде в пробирках не требуется использования анаэростата, а применяют обычный термостат. Таким образом, число колониеобразующих единиц (КОЕ) подсчитывают по двум последним разведениям, в которых наблюдается рост лакто- и бифидобактерий. Лакто- и бифидобактерии растут одинаковыми колониями, поэтому их невозможно идентифицировать друг от друга.

*Примечание 4.* Для удобства подсчета колоний лакто- и бифидобактерий можно содержимое пробирок с посевами микробной взвеси в полужидкой тиогликолевой среде (0,2-0,3% агара), расплавленной до  $t\ 43-45^\circ\text{C}$ , быстро выливать в заранее пронумерованные чистые, стерильные чашки Петри соответственно: из 4-й пробирки в 4-ю чашку Петри, из 5-й пробирки – в 5-ю чашку Петри и т.д. до 10-й чашки. Среду в чашках быстро распределяют покачиванием равномерным слоем, оставляют для остывания. После застывания чашки заворачивают в бумагу, на ней подписывают номера экспертизы и чашек, ставят обязательно в анаэростат на 2-3 суток при  $t\ 37^\circ\text{C}$ .

*Примечание 5.* Так как содержание агара невелико (только 0,2-0,3%), чашки не переворачивают вверх дном во избежание «сползания» агара. Однако желательно этот способ не использовать, т.к. возможно попадание конденсационной воды с крышки чашки Петри на питательную среду и не всегда наблюдаются отдельные изолированные колонии.

*б) определение количества лакто- и бифидобактерий методом последовательных разведений исследуемого материала на физрастворе с последующим высевом на MRS агар для лактобактерий и Bifidobacterium Agar;*

Вначале делают последовательные 10-кратные разведения свежих фекалий (см. п. 2.1.). После последовательного разведения содержимого кишечника или фекалий на физиологическом растворе в пробирках производят последовательно посев в соответствующие номера чашек Петри со средами для выделения лакто- и бифидобактерий (вносят 0,1 мл соответствующего разведения и равномерно распределяют по поверхности плотной среды шпателью), т.е. из пробирки № 4 – в 4-ю чашку Петри с *MRS агаром для лактобактерий* и *Bifidobacterium Agar*. Чашки Петри должны быть заранее пронумерованы. Чашки Петри с засеянными средами, не переворачивая вверх дном, заворачивают в бумагу, подписывают номер разведения и ставят обязательно в анаэростат, удаляют воздух с помощью вакуумного насоса или газогенерирующих пакетов и помещают в термостат при  $t\ 37-37,5^\circ\text{C}$  на

48-72 часа. После инкубирования проводят подсчет колоний и учет результатов аналогично подсчету кишечных палочек, т.е. только в семи чашках от № 4 до № 10, но желательнее для удобства провести подсчет только в трех последних чашках.

Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Из выросших колоний готовят препараты, которые окрашивают по Граму и определяют наличие каталазы.

Для культивирования бифидобактерий наиболее распространенной считается печеночно-цистеиновая среда (среда Блаурока). Для ее приготовления 500 г говяжьей печени, освобожденной от сухожилий, пропускают через мясорубку, заливают двойным количеством воды и кипятят в течение 2 ч, затем отфильтровывают. Фильтрат доводят дистиллированной водой до 1 000 см<sup>3</sup> и вносят 10 г пептона, 10 г лактозы, 100 мг хлористого цистеина, 5 г NaCl и агара 1-2 г, рН среды – 6,8-7,0. Однако эта среда дорогая, содержит дефицитные компоненты, поэтому мало пригодна для использования в промышленных условиях [3].

Для определения количества бифидобактерий в содержимом фекалий рекомендуем использовать *Bifidobacterium Agar*. Состав среды:

- пептон специальный – 23 г/литр;
- натрия хлорид – 5 г/литр;
- глюкоза – 5 г/литр;
- крахмал растворимый – 1 г/литр;
- L-цистеина гидрохлорид – 0,3 г/литр;
- агар-агар – 15 г/литр.

*Приготовление:* Размешать 49,3 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Прокипятить до полного растворения компонентов среды. Разлить в пробирки или флаконы и автоклавировать при 1,1 атм (t 121°C) в течение 15 мин. Остудить до t 50°C и разлить в стерильные чашки Петри. Готовая среда имеет янтарный цвет, прозрачна, слегка опалесцирует в чашках Петри. Конечное значение рН (при t 25°C) – 8±0,2.

Лактобактерий культивируют также на лактобакагаге и среде Рогоза, на которых они образуют мелкие нежные колонии с гладкими или изрезанными краями («паукообразные»). На среде МРС-4 – гладкие белые, выпуклые, средние по величине колонии; могут быть и более крупные, шероховатые, молочно-белые.

Состав среды Блаурокка в модификации Г. И. Гончаровой:

- пептон – 10,0 г;
- натрия хлорид (NaCl) – 5,0 г;
- лактоза – 10,0 г;
- агар-агар – 0,75 г;
- L-цистеин или цистеин солянокислый – 100 мг;
- печеночный отвар – до 100 мл.

Установить рН 7,2–7,4. Стерилизация при 0,5 атм – 30 мин.

Состав среды МРС-4:

- марганца сульфат моногидрат (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) – 0,05 г;
- магния сульфат семиводный (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) – 0,2 г;
- калия фосфат двузамещенный (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) – 2,0 г;
- цитрат аммония – 2,0 г;
- натрия ацетат – 5,0 г;
- пептон – 10,0 г;
- цистеин – 0,2 г;
- сорбиновая кислота – 40,0 мг;
- агар-агар – 16,0 г;
- глюкоза – 20,0 г;

- тви-80 или линетол – 1 мл;
- печеночный экстракт – 100 мл;
- дрожжевой аутолизат – 50 мл (или сухой дрожжевой экстракт – 5,0 г);
- гидролизат молока – 500 мл;
- дистиллированная вода – до 1000 мл.

Стерилизация проводится при 0,5 атм 20 мин. Сорбиновую кислоту в количестве 40 мг растворяют в спирте, добавляют к среде после стерилизации, рН до значения 5,0-5,1 устанавливают 10%-ным раствором лимонной кислоты перед разливом в чашки.

Для определения количества лактобактерий в содержимом фекалий рекомендуем использовать *Lactobacillus MRS Agar*. Состав среды:

- протеозопептон – 10 г/литр;
- мясной экстракт – 10 г/литр;
- дрожжевой экстракт – 5 г/литр;
- глюкоза – 20 г/литр;
- твин-80 – 1 г/литр;
- аммония цитрат – 2 г/литр;
- натрия ацетат – 5 г/литр;
- магния сульфат – 0,1 г/литр;
- марганца сульфат – 0,05 г/литр;
- калия гидрофосфат – 2 г/литр;
- агар-агар – 12 г/литр.

*Приготовление:* Размешать 67,15 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Разлить во флаконы или пробирки. Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм (t 121°C) в течение 15 мин. Конечное значение рН (при t 25°C) – 6,5±0,2.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении бактерий рода *Bifidobacterium* обнаружены грамположительные мелкозернистые, слегка изогнутые с бифуркацией на концах или без нее, расположенные одиночно, группами, иногда цепочками, палисадом, не образующие спор и капсул, каталазоотрицательные палочки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду *Bifidobacterium*.

Ориентировочная идентификация лактобактерий проводится микроскопическим методом (окраска мазка по Граму), которая позволяет оценить морфологию клеток. В мазках лактобактерии имеют вид прямых палочек, расположенных в виде блоков, не имеют спор. Бактерии рода *Lactobacillus* не образуют каталазы и оксидазы.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении бактерий рода *Lactobacillus* обнаружены неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду *Lactobacillus*.

### 3.3. Определение общего количества бацилл

*Общие сведения.* Бациллы относят (Bergey, Second Edition, Vol. 3, 2009) к домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Bacillales*, семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*, включающему 95 видов. Типовой вид – *B. subtilis* [22].

Следует отметить, что, несмотря на применение таких современных методов исследования, как молекулярная идентификация микроорганизмов, многие штаммы рода *Bacillus* окончательно не определены до вида и авторы описывают их физиолого-биохимические характеристики.

К классу *Bacilli* относят также и другие роды спорообразующих бактерий: *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Sporolactobacillus*.

Микроорганизмы рода *Bacillus* широко распространены в природе. Многие из них являются представителями нормальной микрофлоры организма животных и человека (напр. *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* – син. *B. mesentericus*). Некоторые используются в пищевой промышленности как организм-донор генов для выработки бактериоцина коагулина, продуцентов молочной кислоты и др. (*B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens* и др.). Некоторые виды (напр. *B. subtilis*) используются для получения пробиотиков. Среди бацилл имеются бактерии, патогенные для сельскохозяйственных животных. Так, *B. anthracis* является возбудителем сибирской язвы, *B. cereus* обуславливает пищевые отравления. Некоторые виды спорообразующих бактерий являются возбудителями болезней полезных насекомых (*B. cereus* является возбудителем бактериоза пчел листорезов; *Paenibacillus larvae* (син. *B. larvae*) – возбудитель американского гнильца медоносной пчелы; *Paenibacillus alvei* (син. *B. alvei*) и *Brevibacillus laterosporus* (син. *B. laterosporus* = *B. orpheus*) – возбудители европейского гнильца медоносной пчелы; *Paenibacillus popilliae* (син. *B. popilliae* и *Paenibacillus lentimorbus* (син. *B. lentimorbus* – возбудители молочной болезни японского жука).

Спорообразующие бактерии вышеуказанных родов проявляют разнообразную антимикробную активность, связанную в первую очередь с продукцией почти 200 антибиотиков. Наиболее известными их продуцентами являются *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *Paenibacillus polymyxa* (син. *B. polymyxa*), *Brevibacillus laterosporus*, *Brevibacillus brevis* и др.

В настоящее время в род *Bacillus* объединены бактерии, характеризующиеся следующими признаками: прямые или почти прямые палочковидные бактерии, размеры которых  $0,3-2,2 \times 1,2-7,0$  мкм. Большинство подвижно (искл. *B. anthracis*). Жгутики расположены перитрихально. Не образуют капсул (искл. *B. anthracis*, отдельные штаммы *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*). Образуют термоустойчивые эндоспоры, но не более одной в клетке-спорангии. Спорообразование не подавляется экспозицией на воздухе. Окраска по Граму строго положительна или положительна только при окрашивании молодой культуры. Бациллы в основном образуют эллипсоидные споры, располагающиеся центрально. Однако есть виды, у которых споры превышают вегетативную клетку. В зависимости от расположения спор, раздувающих спорангий, клетки принимают либо плектридиальную, либо кластридиальную форму.

Большинство видов рода *Bacillus* – типичные хемоорганотрофы. Они, включая некоторые, главным образом энтомопатогенные формы, хорошо растут на мясопептонном агаре (МПА) при реакции среды, близкой к нейтральной. Отдельные виды развиваются в щелочной среде и требуют особых источников азота или углерода. Оптимальная температура роста обычно варьирует в пределах  $t$  30-40 С. Встречаются виды, развивающиеся при температуре ниже 12 С и выше 50 С.

Культуральные особенности видов, выросших на разных средах, резко различны (таблица 3). На твердых питательных средах образуются колонии от 1-2 до 5 мм и более в диаметре: гладкие, зернистые, пленчатые, складчато-морщинистые и сухие, слизеобразующие и пастообразные с характерной структурой края. Один и тот же вид спороносных бактерий образует на средах различного состава разнообразные колонии. Поэтому при описании культуральных особенностей выращиваемых бактерий строго придерживаются определенного состава питательных сред и условий выращивания. При развитии на жидких средах обнаруживается тенденция к образованию поверхностной пленки.

Встречаются виды, образующие на поверхности агаризованных сред подвижные колонии. Природа этого явления пока недостаточно изучена, считается,



что оно связано с усиленной подвижностью клеток и некоторыми физико-химическими особенностями питательной среды.

На МПА колонии *B. subtilis* и *B. mesentericus* имеют вид плотных сухих морщинистых колоний, вросших в агар с волнистыми выступами по краю.

Через 48 ч роста при  $t + 37^{\circ}\text{C}$  на сусло-агаре культура *B. subtilis* имеет непрозрачные матовые колонии с фестончатым краем. Хорошо снимается петлей с поверхности агара. Культура не растет в анаэробных условиях и в присутствии в среде 10% NaCl.

*B. cereus* – аэроб, но может развиваться и при недостатке кислорода воздуха. На МПА вырастают крупные, распластанные, серовато-беловатые колонии с изрезанными краями, некоторые штаммы образуют розовато-коричневый пигмент; на кровяном агаре – колонии с широкими, резко очерченными зонами гемолиза (образование на кровяном агаре зон гемолиза не является постоянным признаком у *B. cereus*, так как некоторые штаммы и разновидности *B. cereus* (например, *Var. sotto*) не вызывают гемолиза эритроцитов); на МПБ – образует нежную пленку, пристеночное кольцо, равномерное помутнение и хлопьевидный осадок на дне пробирки. Все штаммы *B. cereus* интенсивно растут при pH от 9 до 9,5; при pH 4,5-5 прекращают развитие. Оптимальная температура развития  $30-32^{\circ}\text{C}$ , максимальная –  $37-48^{\circ}\text{C}$ , минимальная –  $10^{\circ}\text{C}$ .

*Bacillus mycoides* на МПА с добавлением 40%-ного раствора глюкозы образуют беловато-серый налет с ветвистыми выростами. На 5%-ном кровяном агаре образует сероватые зернистые колонии. В названии *B. mycoides* отражена его способность развиваться на питательных средах в виде ложногрибкового налета (лат. *mycoides* – грибовидный), напоминающий мицелий грибов. При росте данного микроба на декстрозном бульоне образуется паутиная пленка, которая в пробирке располагается в форме конуса основанием вверх.

В качестве источника углеродного питания спорообразующие бактерии могут использовать как простые сахара, так и полисахариды. Из моносахаридов лучше всего они усваивают глюкозу, а из дисахаридов – сахарозу. Отношение разных видов спорообразующих бактерий к углеводам различное, что широко используется в исследованиях по систематике для определения видовой принадлежности микроорганизмов. Кислоту и газ продуцируют лишь бактерии некоторых видов, все остальные при росте на углеводах образуют одну кислоту. Большинство видов образует каталазу (таблица 3).

*Определение общего количества бацилл.* При выделении спорных форм микроорганизмов с целью получения чистой культуры бацилл рекомендуем применить метод прогревания. Для этого вначале делают разведение фекалий на физрастворе. Берут 1 мл свежих фекалий (т.е. 1 мл исходной микробной взвеси) и 9 мл физраствора, получают разведение 1:10. Эту пробирку № 1 прогревают в водяной бане при температуре  $65-75^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут для уничтожения неспорообразующих бактерий и вегетативных форм бацилл. После остывания на основе 1-й пробирки делают последовательное разведение микробной взвеси фекалий от  $1:10^2$  до  $1:10^{10}$  (см. п. 2.1.) в пробирках с 9 мл физраствора.

*Примечание 1.* Прогревают только первую пробирку в разведении 1:10, но не остальные.

*Примечание 2.* Возможно для выделения бацилл использовать тиогликолевую среду, рецепт ее приготовления описан в п. 3.3.

**Таблица 3 – Сравнительная характеристика биологических свойств некоторых видов бацилл**

Виды рода <i>Bacillus</i>	Морфология клеток	Вид колонии	Условия роста	Т°С max/min	Гемолиз	Лецитин	Гидролиз	Манн	Глюкоза	Ката-
<i>B. cereus</i>	Грам + палочки, 1,0-1,2 / 3-5 мкм, подвижны	Сероватые, пленчатые, со слегка изрезанными краями	Аэроб или факультативный анаэроб	45/10	+, -	+	+	-	+	+
<i>B. mycoides</i>	Грам + палочки, 0,8-1,2 / 2-4 мкм, подвижны	Сочный беловато-серый плёнчатый рост с ветвистыми выростами	Аэроб или факультативный анаэроб	42/10	+	+	-	+	-	+
<i>B. megaterium</i>	Грам + палочки, 1,0-1,5 / 2-5 мкм, подвижны	Колонии складчатые	Аэроб	45/3	+	-	+	-	+	+
<i>B. subtilis</i>	Грам + палочки, 0,7-0,8 / 2-3 мкм, подвижны	Сухие, морщинистые с волнистыми краями	Аэроб	55/5	+	-	+	+	+	+
<i>B. pumilus</i> – син. <i>B. mesentericus</i>	Грам + палочки, тонкие 0,5-0,6 / 3-10 мкм, подвижны	Желтовато-бурые, сухие морщинистые	Аэроб	45/10	+	-	+	+	+	+

Примечания: «+» – положительная реакция; «-» – отрицательная реакция; (+, -) – положительная, но встречаются штаммы, не обеспечивающие данный признак.

После последовательного разведения микробной взвеси в пробирках производят последовательно посев на поверхность агаризованной среды по 0,1-0,2 мл взвеси фекалий в соответствующие номера чашек Петри с МПА или путем внесения материала в агаризованную среду, т.е. из пробирки № 4 – в 4-ю чашку Петри с МПА и т.д. Пробирки и чашки Петри должны быть заранее пронумерованы. Чашки Петри с засеянным МПА (см. 3.2.) переворачивают вверх дном, заворачивают в бумагу, подписывают номер экспертизы и ставят в термостат при t 37-37,5°С на 24-48 часов. После инкубирования проводят подсчет колоний и учет результатов аналогично подсчету кишечных палочек, т.е. только в семи чашках от № 4 до № 10, но желательно для удобства провести подсчет только в трех последних чашках. Результаты подсчета заносят в таблицу, аналогичную таблице 1, и учитывают показатели.

### 3.4. Определение общего количества клостридий

*Общие сведения.* В процессе эволюционного развития и дифференциации видов клостридии приспособились к существованию в самых различных условиях. Они являются нормальными обитателями почвы. Различные их виды суще-

ствуют в морских и пресноводных отложениях, в пищеварительном тракте различных представителей фауны, особенно позвоночных. Клостридии принимают участие в разложении органических веществ растительного и животного происхождения. Некоторые являются фиксаторами атмосферного азота. Отдельные виды находят применение в микробиологической промышленности как продуценты для получения химических веществ (ацетона, бутанола), ферментов и т.д. [9, 10].

Среди клостридий имеются и возбудители болезней человека и животных, всего 12 видов. Главными отличительными признаками патогенных клостридий являются особенности питания и способность продуцировать высокоактивные токсины, которым принадлежит ведущая роль в патогенезе вызываемых ими болезней, объединенных под общим названием клостридиозы. Они являются возбудителями анаэробной энтеротоксемии, столбняка, ботулизма, злокачественного отека (газовой гангрены), эмфизематозного карбункула, браздота и некротического гепатита овец, анаэробной дизентерии ягнят, остеомиелита буйволов, бациллярной гемоглобинурии крупного рогатого скота, некротического энтерита и токсикоинфекции людей.

Среди известных видов, встречающихся в содержимом кишечника, следует отметить *Clostridium perfringens* (син. *Cl. welchii*). Подобно другим клостридиям, они широко распространены во внешней среде, особенно в окультуренных (унавоженных) почвах. Они сохраняются здесь не только в виде спор, но и активно вегетируют, особенно при повышенной (45°C) температуре. Вместе с тем представители этого вида, пожалуй, больше, чем другие клостридии, экологически связаны с кишечником человека и животных. Патогенные штаммы данного микроорганизма обуславливают анаэробную энтеротоксемию и злокачественный отек у животных. Реже выделяются из кишечного содержимого *Cl. difficile*, *Cl. botulinum*, *Cl. tetani* и др.

По современной классификации род клостридии входит в семейство *Clostridiaceae*, порядок *Clostridiales*, класс *Clostridia*, тип *Firmicutes*, группу без ранга – *Terrabacteria group*, царство Бактерии. Родовое название *Clostridium* дано на основании сходства споровых форм микроорганизмов с веретеном (от греч. *closter* – веретено), которое они приобретают в результате раздувания бактериальных клеток крупными спорами, располагающимися в центре или ближе к одному концу.

Вместе с тем в последние годы клостридии были серьезно реклассифицированы, в частности [9, 10]:

Вид *Clostridium difficile* был перенесен в род *Peptoclostridium* семейства *Peptostreptococcaceae* и ему присвоено наименование *Peptoclostridium difficile* (эквивалентное имя *Clostridium difficile*). Также в этот род были перенесены виды: *Cl. hiranonis*, *Cl. litorale*, *Cl. manganotii*, *Cl. paradoxum*, *Cl. sticklandii* и *Cl. thermoalcaliphilum*.

Вид *Cl. histolyticum* был перемещен в род *Hathewayia* семейства *Clostridiaceae* и ему присвоено наименование *Hathewayia histolytica*. В этот же род были перенесены виды *Cl. limosum* и *Cl. proteolyticum* с изменением наименования на *Hathewayia limosa* и *Hathewayia proteolytica*, соответственно.

Виды *Cl. aerotolerans*, *Cl. aldenense*, *Cl. algidixylanolyticum*, *Cl. aminophilum*, *Cl. amygdalinum*, *Cl. asparagiforme*, *Cl. bolteaе*, *Cl. celerecrescens*, *Cl. citroniae*, *Cl. clostridioforme*, *Cl. fimetarium*, *Cl. glycyrrhizinilyticum*, *Cl. herbivorans*, *Cl. hylemonae*, *Cl. indolis*, *Cl. lavalense*, *Cl. methoxybenzovorans*, *Cl. oroticum*, *Cl. phytofermentans*, *Cl. polysaccharolyticum*, *Cl. populeti*, *Cl. saccharolyticum*, *Cl. scindens*, *Cl. sphenoides*, *Cl. symbiosum*, *Cl. xylanolyticum* были перенесены в род *Lachnoclostridium* семейства *Lachnospiraceae*.

Вид *Clostridium ramosum* был реклассифицирован в качестве предложенно-

го вида *Erysipelatoclostridium ramosum* (NCBI Taxonomy, 2016). По результатам геномного анализа предлагается также подвергнуть реклассификации других представителей кластридий: в частности, *Clostridium bifermentans* перевести в другой род с видовым названием *Paraclostridium bifermentans*; для видов *Clostridium sordellii* и *Clostridium ghonii* предложен новый таксон *Paeniclostridium* с соответствующими видовыми названиями *Paeniclostridium sordellii* и *Paeniclostridium ghonii*.

В настоящее время к роду *Clostridium* относится 140 видов, в их числе: *Cl. amylolyticum*, *Cl. aminovorans*, *Cl. botulinum*, *Cl. fallax*, *Cl. haemolyticum*, *Cl. chauvoei*, *Cl. novyi*, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. sordelli*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tetani*, *Cl. butyricum*, *Cl. putrefaciens*, *Cl. ruminantium* и др.

Кластридии обладают рядом общих характеристик. По морфологическим признакам представители рода кластридий представляют собой палочки обычно крупных размеров ( $0,8-1,5 \times 4-8$  и более мкм), не образующие капсул (искл. *Cl. perfringens*). Отдельные виды при определенных условиях образуют короткие цепочки, иногда и длинные нити. Все они образуют споры, имеющие овальную или сферическую форму и располагающиеся внутри бактериальной клетки. Экспотенциально растущие клетки окрашиваются по Граму положительно, при переходе в стационарную фазу они становятся грамотрицательными. Большинство видов подвижные (искл. *Cl. perfringens*). Движение осуществляется с помощью перитрихально расположенных жгутиков. Растут на специальных питательных средах, в состав которых входят компоненты, обеспечивающие энергетический метаболизм в анаэробных условиях: среды Китта-Тароцци, Вильсон-Блера, Цейслера и др.

Характерной особенностью кластридий является анаэробный тип энергетических процессов. Многие виды – строгие анаэробы, некоторые могут расти в присутствии воздуха при атмосферном давлении. Одни виды – сахаролитические, другие – протеолитические, третьи – обладают обоими этими свойствами: сбраживают сахара, многоатомные спирты, аминокислоты, пурины и другие органические соединения. Кластридии не восстанавливают сульфиты, характерным для них является отсутствие каталазы – фермента, катализирующего разложение перекиси водорода.

К роду *Clostridium* относятся также сульфитредуцирующие бактерии, которые примерно на 90% представлены видом *Cl. perfringens*. Поэтому, говоря о сульфитредуцирующих кластридиях, обычно имеют в виду именно эти микроорганизмы.

*Определение общего количества кластридий.* Для выявления в фекалиях кластридий используют среду Вильсона-Блера. По 1 мл прогретой взвеси фекалий из разведений  $10^{-3}$ - $10^{-8}$  засевают в расплавленную и охлажденную до  $t\ 50^{\circ}\text{C}$  среду Вильсон-Блера (по две пробирки каждого разведения). По одной пробирке каждого разведения помещают в водяную баню при  $t\ 80^{\circ}\text{C}$  на 20 мин. Можно прогреть только первую пробирку в разведении 1:10, но не остальные. Время термообработки начинают отсчитывать с того момента, когда содержащееся в пробирке исходное разведение фекалий достигнет указанной температуры. После термообработки пробирку немедленно охлаждают под струей водопроводной воды.

*Примечание 1.* Выделение кластридий можно проводить в чашках Петри. С этой целью по  $1\ \text{см}^3$  разведения фекалий вносят в две стерильные чашки Петри. Посевы заливают расплавленной средой Вильсон-Блера (агаризованная), измененной для анаэробов. После затвердения среды в чашки Петри для образования второго слоявливают еще  $10\ \text{см}^3$  голодного агара.

Посевы инкубируют при  $t\ 37\pm 1^{\circ}\text{C}$  не более 72 ч. Посевы на чашках Петри инкубируют в анаэробных условиях. Ежедневно посевы просматривают для обнаружения признаков роста сульфитредуцирующих микроорганизмов – почернения

сульфитной среды. О количестве клостридий судят по числу черных колоний в глубине агарового столбика Вильсон-Блер. Вместо данной среды можно использовать триптозо-сульфит-цикосериновый агар, дифференциальную улучшенную клостридиальную среду, железосульфитную среду и др.

Из посевов на агаризованные среды отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Не менее 5 отобранных овальных черных или окруженных черным или серым ореолом колоний диаметром 4-5 мм высевают отдельно в свежерегенерированную среду Китта-Тароцци. Для регенерации перед употреблением пробирки со средой помещают в водяную баню и прогревают  $20 \pm 1$  мин. при температуре  $100 \pm 1^\circ\text{C}$ . Затем их охлаждают водопроводной водой. Посевы инкубируют при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  не более 48 ч.

Для подтверждения принадлежности выделенных сульфит-редуцирующих микроорганизмов к роду *Clostridium* из выросших культур (овальные черные или окруженные черным или серым ореолом колонии диаметром 4-5 мм) готовят два препарата и окрашивают первый – по Граму, второй – по Циллю-Нильсену для выявления бактериальных спор.

Сульфитредуцирующие клостридии представляют собой грамположительные палочки, располагающиеся в одиночку, попарно, в виде цепочек или скопленных параллельных клеток. При спорообразовании споры сульфитредуцирующих клостридий овальные или сферические, субтерминальные или терминальные.

Затем проводят определение отсутствия каталазы. Сульфитредуцирующие клостридии каталазу не образуют. Подтверждение анаэробного роста проводят посевом выросших культур (овальные черные или окруженные черным или серым ореолом колонии диаметром 4-5 мм) в чашки Петри с одной из агаризованных питательных сред, указанных выше. Посевы инкубируют в аэробных условиях при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 18-72 ч. Для сульфитредуцирующих клостридий характерен анаэробный рост.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств обнаружены сульфитредуцирующие грамположительные, каталазоотрицательные, способные расти в анаэробных условиях микроорганизмы, то дают заключение о том, что эти микроорганизмы относятся к сульфитредуцирующим клостридиям.

*Состав сред.* Железосульфитная среда: к  $1 \text{ дм}^3$  дистиллированной воды добавляют 10,0 г триптона, 0,5 г сульфита натрия, 0,5 г железа (III) цитрата, 15,0 г агара (при приготовлении агаризованной среды) или 1,5 г агара (при приготовлении вязкой среды). Растворяют компоненты при нагревании, после этого смесь охлаждают до  $t 50 \pm 5^\circ\text{C}$ . Устанавливают рН среды таким образом, чтобы он составлял  $(7,1 \pm 0,1)$  (в пересчете на  $t 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Среду разливают в пробирки по  $10-12 \text{ см}^3$  или колбы и стерилизуют при  $t 121 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

Триптон может быть заменен на равноценную навеску сухого панкреатического гидролизата казеина или на десятикратный объем жидкого панкреатического гидролизата казеина, а триптон и  $1 \text{ дм}^3$  воды могут быть заменены на  $1 \text{ дм}^3$  мясной воды, приготовленной по п. 3.2.

Среда Вильсон-Блера (агаризованная), измененная для анаэробов: к  $1 \text{ дм}^3$  стерильного, расплавленного и охлажденного до  $t 80 \pm 1^\circ\text{C}$  мясопептонного агара или железосульфитной среды, добавляют  $10 \text{ см}^3$  раствора сульфита натрия и  $1 \text{ см}^3$  раствора аммония железа (III) сульфата. Среду хранят в защищенном от света месте при  $t 6 \pm 2^\circ\text{C}$  не более 7 суток.

Для определения количества клостридий в содержимом желудочно-кишечного тракта или фекалиях рекомендуем использовать метод поверхностного посева, для чего 10-кратные разведения фекалий (по 0,1-0,2 мл) из пробирок от № 3 (разведение  $10^3$ ) до № 8 (разведение  $10^8$ ) вносят стерильной пипеткой на по-

верхность *Anaerobic Agar* в чашках Петри и тщательно растирают шпателем. Пробирки и чашки Петри соответственно нумеруют.

Засеянные чашки выдерживают в анаэробных условиях 24-48 ч в термостате при  $t$  37-38°C.

Состав *Anaerobic Agar* для выделения клостридий:

- гидролизат казеина – 20 г/литр;
- глюкоза – 10 г/литр;
- натрия хлорид – 5 г/литр;
- натрия тиогликолят – 2 г/литр;
- натрия формальдегидсульфоксилат – 1 г/литр;
- метиленовый синий – 0,002 г/литр;
- агар-агар – 20 г/литр.

*Приготовление:* Размешать 58,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Подогреть до кипения до полного растворения частиц. Разлить в необходимом количестве. Стерилизовать автоклавированием при 1 атм ( $t$  121°C) в течение 15 мин. Конечное значение рН (при  $t$  25°C) –  $7,2 \pm 0,2$ . Готовая среда имеет светло-янтарную окраску, прозрачна или слегка опалесцирует, если в чашках Петри формируется гель. При длительной аэрации среда зеленеет. Следует отметить, что метиленовый синий подавляет рост некоторых анаэробов. Данная среда содержит тиогликолят натрия и формальдегидсульфоксилат натрия, которые обеспечивают достаточно низкий окислительно-восстановительный потенциал. Степень анаэробноза контролируется по цвету индикатора (метиленового синего), который в присутствии кислорода синеет. Гидролизат казеина и глюкоза обеспечивают микроорганизмы необходимыми питательными веществами, а хлорид натрия поддерживает оптимальное осмотическое давление среды.

Порошок (среда) хранят при температуре ниже +25°C, используют до даты, указанной на этикетке. Готовую среду хранить при температуре +2...8°C.

В таблице 4 отображены ростовые характеристики некоторых референс-штаммов клостридий через 48-72 ч при  $t$  35°C в анаэробных условиях на анаэробном агаре.

Далее посеы инкубируют и учитывают результаты исследований, как указывалось выше в п. 2.2. и 3.1.

**Таблица 4 – Ростовые характеристики референс-штаммов клостридий через 48-72 ч при  $t$  35°C в анаэробных условиях на *Anaerobic Agar***

Штамм микроорганизмов (АТСС)	Рост
<i>Clostridium butyricum</i> (9690)	Обильный
<i>Clostridium perfringens</i> (12914)	Обильный
<i>Clostridium sporogenes</i> (11437)	Обильный

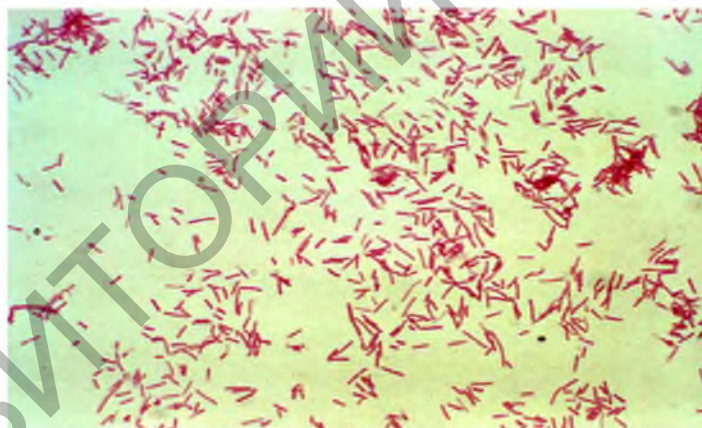
### 3.5. Определение общего количества бактериоидов

*Общие сведения.* Название «бактероиды» связано с необычной формой представителей этого рода: микробная клетка имеет форму короткой палочки с уширенной серединой, что отдаленно напоминает бочонок. Это род грамотрицательных анаэробных бактерий, наиболее типичные нормальные обитатели кишечника человека и животных [2, 4].

Род *Bacteroides* включает 52 вида бактерий: *B. acidifaciens*, *B. barnesiae*, *B. caccae*, *B. caecicola*, *B. caecigallinarum*, *B. caecimuris*, *B. cellulosilyticus*, *B. clarus*, *B. coprocola*, *B. coprophilus*, *B. coprosuis*, *B. denticanum*, *B. dorei*, *B. eggerthii*, *B. faecichinchillae*, *B. faecis*, *B. finegoldii*, *B. fluxus*, *B. fragilis*, *B. galacturonicus*, *B. gallinaeceum*, *B. gallinarum*, *B. graminisolvens*, *B. helcogenes*, *B. heparinolyticus*, *B. ihuae*, *B. intestinalis*, *B. luti*, *B. massiliensis*, *B. mediterraneensis*, *B. neonati*, *B. nordii*, *B. oleiciplenus*, *B. ovatus*, *B. paurosaccharolyticus*, *B. plebeius*, *B. propionificaciens*, *B. pyogenes*, *B. reticulotermitis*, *B. rodentium*, *B. salanitronis*, *B. salyersiae*, *B. sartorii*, *B. stercorisoris*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. timonensis*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *B. xylanisolvens*, *B. xylanolyticus*, *B. zoogloformans*.

Ранее к роду бактероиды относился целый ряд видов, впоследствии реклассифицированные в виды рода *Prevotella*. В частности, *Bacteroides melaninogenicus* и *Bacteroides intermedius* были реклассифицированы в *Prevotella melaninogenica* и *Prevotella intermedia*, вид *Bacteroides urealyticus* перенесен в род *Campylobacter* и назван *Campylobacter ureolyticus*, виды *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* и *Bacteroides merdae* реклассифицированы в виды *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii* и *Parabacteroides merdae* рода парабактероидов, соответственно.

Бактероиды полиморфны, часто имеют форму палочки с закругленными концами размером  $1-3 \times 0,5-0,8$  мкм. Бактерии не образуют спор, но могут образовывать капсулы (*B. fragilis*), неподвижные или движущиеся с помощью перитрихально расположенных жгутиков, располагающиеся поодиночке или парами, короткими цепочками из 3-4 клеток (рисунок 5).



**Рисунок 5 – *B. fragilis* (чистая культура, окраска по Граму)**

Источник : <http://www.awetism.net/a-probiotic-can-ease-autism-symptoms-so-why-cant-you-buy-it/>

Основными компонентами питательных сред для культивирования бактероидов являются пептон, мясной экстракт, дрожжевой экстракт, глюкоза и кровь. Стимулируют рост бактероидов гемин, викасол (менадион), для некоторых видов – бычья желчь. Рост бактероидов улучшается также, если в окружающей анаэробной атмосфере содержится углекислый газ (5-10%). Бактероиды растут медленно (5-7 дней), в значительном диапазоне температур (от 25 до 45°C), оптимум роста – при  $t$  37°C. Оптимальное значение pH питательных сред 7,0.

Культивируют бактероидов на специальных питательных средах (кровяной, сывороточный, тиогликолевый агар с добавлением экстрактов из мозговой ткани, гемина, витамина К) в строгих анаэробных условиях в атмосфере 10% CO<sub>2</sub> при  $t$  37°C.

При росте на кровяном агаре бактероиды образуют округлые, слабодыспук-

лые, полупрозрачные сероватые или черно-коричневые колонии, часто имеющие внутри включения в форме концентрических колец, диаметр колоний – 1-3 мм, менее 1% штаммов бактероидов вызывают гемолиз. При росте бактероидов на жидкой питательной среде происходит равномерное помутнение бульона и образование осадка.

В мазках, окрашенных по Граму, *B. fragilis* имеют вид прямых или немного изогнутых грамотрицательных палочек, без спор и капсул, расположенных в одиночку, парами или короткими цепочками из 3-4 клеток. При окраске метиленовым синим часто окрашиваются биполярно.

Колонии *B. fragilis* мелкие (до 1 мм), немного вогнутые, серовато-белые, без зон гемолиза. *Prevotella melaninogenica* (син. *Bacteroides melaninogenicus*) на кровяных средах образует гладкие или шероховатые колонии диаметром 1-3 мм черного цвета, иногда с зоной гемолиза вокруг них. Выделенные чистые культуры идентифицируют по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам. Штаммы *B. fragilis* ферментируют глюкозу, лактозу, сахарозу, не ферментируют рамнозу, не образуют индола, но выделяют сероводород. Ключевые признаки для идентификации вида – рост на среде с 20% желчных солей, резистентность к канамицину (100 мкг), ванкомицину (5 мкг) и колистину (10 мкг), которую определяют методом дисков.

Культуры *Prevotella melaninogenica* (син. *Bacteroides melaninogenicus*) ферментируют глюкозу, лактозу и сахарозу, не ферментируют маннит, гидролизуют крахмал и гликоген. Ключевыми признаками вида являются образование пигмента, отсутствие роста на желчных средах, чувствительность к колистину, устойчивость к ванкомицину и канамицину.

*Определение общего количества бактероидов.* Вначале делают последовательные 10-кратные разведения свежих фекалий (см. п. 2.1.). После последовательного разведения содержимого кишечника или фекалий на физиологическом растворе в пробирках производят последовательно посев в соответствующие номера чашек Петри со средами для выделения бактероидов. Далее посевы инкубируют в строгих анаэробных условиях в атмосфере 10% CO<sub>2</sub> при t 37°C 5-7 дней и учитывают результаты исследований, как указывалось выше в п. 2.2. и 3.1.

### 3.6. Определение общего количества стрептококков

*Общие сведения.* Стрептококков относят (Bergey, Second Edition, Vol. 3, 2009) к: домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, который насчитывает 62 вида, и семейству *Enterococcaceae*, роду *Enterococcus*, который насчитывает 29 видов.

Стрептококки – бактерии сферической формы, диаметр клеток от 0,6 до 1 мкм, грамположительны, неподвижны, спор и капсул не образуют (образуют капсулу – *Str. pneumoniae*, *Str. equi subsp. zooepidemicus*). В поле зрения микроскопа в препаратах могут располагаться одиночно, попарно и короткими цепочками (от греч. *streptos* – цепочка), например, *Str. equi subsp. equi*, а также скоплениями неопределенной формы.

Стрептококки – факультативные анаэробы, некоторые разновидности – аэробы, более требовательны к питательным средам, чем стафилококки, температурный оптимум роста – 37-38°C, pH сред – 7,2-7,4. Хорошо растут в МПБ с добавлением 1% глюкозы и 15-20% сыворотки крови лошади, на МПА – 1% глюкозы и 10% дефибринированной крови (или ее сыворотки) барана или кролика. Сывороточная зависимость у разных видов стрептококков варьирует. Стрептококки более требовательны к составу питательных сред по сравнению с энтерококками [17].



В жидкой питательной среде наблюдают придонный и пристеночный рост, помутнение бульона, образование крошковидного осадка. На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона просветления – бета-гемолиз. Стрептококки могут вызывать альфа-гемолиз, т.е. вокруг колонии наблюдают зеленую зону гемолиза вследствие превращения гемоглобина в метгемоглобин.

Для культивирования стрептококков используют среду *Columbia agar* (*BioMerioux, Becton Dickinson, Oxoid*) с добавлением лошадиной или бараньей дефибрированной крови (5%), налидиксовой кислоты (15 мг/л) и колистина (10 мг/л). Кроме стрептококков на этой среде растут коагулазопозитивные стафилококки. В связи с этим, перед идентификацией бактерий необходимо исследовать на наличие каталазы (стафилококки ее выделяют).

Энтерококки хорошо растут на простых питательных средах, выдерживают до 6,5% NaCl. Они – факультативные анаэробы. Диапазон температур для роста от 10 до 45°C, оптимальная температура – 35-37°C. На жидких средах дают диффузный рост. В средах с молоком, кровью, сывороткой формируют водонерастворимый пигмент белого или лимонно-желтого цвета.

На кровяном агаре (40% желчи, рН 7,4) растут мелкие колонии, прозрачные, со слабо-коричневой окраской. На этой среде энтерококки могут приводить к образованию зоны неполного или полного (редко) гемолиза.

На мясопептонном агаре с углеводами и рН 7,4 энтерококки образуют три типа колоний:

- 1) мелкие, прозрачные, размером 0,5-0,6 мм, выпуклые, гладкие с блестящей поверхностью, ровными краями, под микроскопом почти бесструктурные;
- 2) более крупные, прозрачные, размером до 1 мм, выпуклые, с гладким краем, блестящей поверхностью, под микроскопом мелкозернистые;
- 3) крупные и средние, размером 0,7-1,2 мм, прозрачные с беловато-мутным центром, края гладкие, поверхность блестящая, под микроскопом мелкозернистые.

Характерная особенность энтерококков – их способность при массивном посеве давать сплошной газон в отличие от стрептококков, растущих даже при густом посеве изолированными колониями.

Для выделения энтерококков используют также селективно-дифференциальные среды: *Enterococcus agar* (*Serva*), *Enterococcus agar* (*Difco*), *Slanes and Bartley agar* или *Bile Esculine agar* (*Oxoid*) и др. При проведении количественного исследования посев производится из исходного материала в разведениях  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$ . Во все среды, кроме *Bile Esculine agar*, входит трифенилтетразольный хлорид (ТТХ), который, расщепляясь энтерококками, придает их колониям характерную розовую или малиновую окраску. В состав среды *Bile Esculine agar* входят соли желчи, к которым устойчивы энтерококки. Кроме того, в среду входят эскулин и цитрат железа. Энтерококки (*Ent. faecalis*) способны гидролизовать эскулин с образованием эскулетина и глюкозы. Эскулетин, связываясь с цитратом железа, образует комплекс черного цвета, который придает характерную черную окраску колониям энтерококков и среде вокруг них.

Клетки энтерококков полиморфны, но преимущественно овальные (размером  $0,6-2,0 \times 0,6-2,5$  мкм), спор не образуют. В мазках из сахарных сред имеют круглую, овальную или ланцетовидную формы, располагаются парами, небольшими скоплениями, реже – короткими цепочками. Большинство видов энтерококков неподвижны, некоторые ограничено подвижны (имеют небольшие жгутики), иногда синтезируют капсулу.

С целью дифференциации видов рода *Streptococcus* и *Enterococcus* изучают рост культур, засеянных в глюкозо-сывороточный бульон с 40% желчи, 6,5%

натрия хлорида, а также на обычном МПБ, выращенных при  $t$  37°C и 45°C.

При определении интенсивности роста на обычном МПБ (без сыворотки крови) при  $t$  37°C энтерококки дают видимый рост. Стрептококки же вызывают слегка заметное помутнение в бульоне. В случае *S. suis* рост отсутствует (в течение первых суток). Для энтерококков и стрептококков серологической группы D характерны рост при  $t$  45°C, устойчивость к 40% желчи и гидролиз эскулина, но есть некоторые исключения. Кроме энтерококков, на среде с 40% желчи могут давать рост *S. bovis*, *S. porcicus*, *S. suis*, *S. agalactiae*, *S. equinus*, *S. uberis*, *S. equisimilis*, *S. pyogenes*.

На среде с 6,5% натрия хлорида растут энтерококки, могут расти штаммы *S. agalactiae*, *S. porcicus*, *S. equi subsp equi*, реже – некоторые другие.

Принимая во внимание указанные исключения, характер роста на питательных средах и происхождение исследуемого материала, можно по совокупности признаков отнести выделенные культуры к стрептококкам или энтерококкам.

**Определение общего количества стрептококков.** Для определения количества стрептококков (энтерококков) в содержимом фекалий вначале делают последовательные 10-кратные разведения свежих фекалий (см. п. 2.1.). После последовательного разведения содержимого кишечника или фекалий на физиологическом растворе в пробирках производят последовательно посев в соответствующие номера чашек Петри со средами для выделения стрептококков (энтерококков) по методу Коха, шпателем растирая внесенное по 0,1-0,2 мл соответствующее разведение фекалий. С этой целью рекомендуем использовать желчно-эскулиновый агар с азидом натрия. Среда высокопитательная, поскольку содержит гидролизат казеина, пептический перевар животной ткани, протеозопептон, дрожжевой экстракт и мясной экстракт. Азид натрия подавляет рост грамотрицательных микроорганизмов, но позволяет расти фекальным стрептококкам. Гидролиз эскулина и толерантность к желчи позволяют выделять и идентифицировать стрептококки группы D в течение 24 ч. Среда имеет янтарную окраску, прозрачна или слегка опалесцирует с голубым оттенком, если в чашках Петри формируется гель. В таблице 5 отображены ростовые характеристики некоторых референс-штаммов бактерий через 18-24 ч при  $t$  35-37°C на желчно-эскулиновом агаре с азидом натрия.

Состав среды:

1. Протеозопептон – 3 г/литр.
2. Гидролизат казеина – 17 г/литр.
3. Мясной экстракт – 5 г/литр.
4. Oxgall (препарат желчи) – 10 г/литр.
5. Натрия хлорида – 5 г/литр.
6. Эскулин – 5 г/литр.
7. Железа аммонийного цитрат – 0,5 г/литр.
8. Натрия азид – 0,15 г/литр.
9. Агар-агар – 15 г/литр.

**Таблица 5 – Ростовые характеристики референс-штаммов бактерий через 18-24 ч при  $t$  35-37°C на желчно-эскулиновом агаре с азидом натрия**

Штамм микроорганизмов (АТСС)	Рост	Гидролиз эскулина
<i>Enterococcus faecalis</i>	Обильный	+
<i>Streptococcus bovis</i>	Обильный	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Обильный	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	Хороший	–
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Слабый или отсутствует	–

Примечания: «+» – почернение среды; «–» – цвет не изменен.

**Приготовление:** Размешать 56,65 г порошка в 1000 мл дистиллированной

воды. Подогреть до кипения для полного растворения компонентов среды. Разлить в пробирки или флаконы и автоклавировать при 1,1 атм ( $t$  121°C) в течение 15 мин. Конечное значение pH (при  $t$  25°C) –  $7,1 \pm 0,2$ .

Далее посе́вы инкубируют и учитывают результаты исследований, как указывалось выше в п. 2.2. и 3.1.

### 3.7. Определение общего количества актиномицетов, дрожжеподобных и плесневых грибов

*Общие сведения.* Для культивирования дрожжей, плесеней и актиномицетов используют различные питательные среды, как плотные, так и жидкие: среду Сабуро, Чапека, мозговые среды, жидкое пивное сусло, сусло-агар, Сабуро-Мальтоза агар и др. Наиболее широкое применение получила среда Сабуро. Она содержит пептон, глюкозу, агар-агар. Температура культивирования плесневых грибов – 22-29°C, дрожжеподобных – 22-37°C, время культивирования соответственно – до 10-15 и 1-7 суток. Для получения чистой культуры грибов к питательным средам добавляют различные вещества, подавляющие рост посторонней микрофлоры, например антибиотики (пенициллин, стрептомицин и др.). Используют также сочетание бычьей желчи, кристаллического фиолетового и стрептомицина, которые добавляют к среде Сабуро [4, 17].

Колонии плесневых грибов на плотных питательных средах достигают размера 0,5-5 см. Поверхность колонии может быть бугристой, складчатой, иногда плоской, консистенция – рыхлой. Цвет колоний грибов разнообразный: беловато-желтый, коричневый, оранжевый, красный, бурый, черный, зеленоватый. На жидких питательных средах плесени образуют серовато-беловатое войлокообразное сплетение мицелия или густой конгломерат из пушистых холмиков. В отличие от бактерий многие грибы не вызывают при росте помутнения среды.

Род *Candida* насчитывает около 80 видов. Кандиды – дрожжеподобные грибы. Это одноклеточные микроорганизмы (от  $1,5 \times 1,5$  до  $6 \times 10$  мкм). Хорошо окрашиваются простыми методами, по Граму «+», Романовскому-Гимзе. Грибы можно исследовать и в неокрашенном состоянии в капле воды или глицерина. Форма – овальная, округлая, иногда овально-вытянутая. Они образуют псевдомицелий (нити из удлинённых клеток), бластоспоры (клетки-почки, сидящие на перетяжках псевдомицелия), хламидоспоры – споры с плотной двойной оболочкой.

Кандиды – аэробы, хорошо растут на плотных и жидких средах с добавлением глюкозы (МПА и МПБ), Сабуро, сусло-агаре при pH 6,0-6,5 и температуре 30-37°C.

Характер колоний и рост на жидких средах для разных видов грибов рода *Candida* различен. Колонии дрожжей и дрожжеподобных грибов могут быть плоскими или куполообразными, гладкими, блестящими, иногда слегка исчерченными или складчато-бугристыми. Консистенция их сметанообразная с различными оттенками: беловато-желтоватые, коричневые, желтые и темные. Размеры колоний несколько меньше, чем у плесневых грибов. На жидких средах растут сплошной пристеночной пленкой, дают рыхлый осадок или равномерное помутнение среды.

*Candida albicans* на плотной среде с углеводами образуют довольно крупные (1 см), напоминающие сметану колонии молочно-белого цвета, вначале гладкие, влажные, позднее более выпуклые, иногда с морщинистым центром или секторами. Для дифференциации видов изучают биохимические свойства (кандиды активны в биохимическом отношении).

Актиномицеты – ветвящиеся бактерии. Не содержат в клеточной стенке хитина или целлюлозы, в отличие от грибов, имеют строение грамположительных

бактерий. Мицелий примитивен. Тонкие прямые или слегка изогнутые палочки размером  $0,2-1,0 \times 2,5$  мкм, часто образуют нити длиной до 10-50 мкм.

Способны образовывать хорошо развитый мицелий, у одних видов он длинный, редко ветвящийся, у других короткий и сильно ветвящийся, гифы мицелия не септированы. Палочковидные формы, часто с угольподобными концами, в мазке располагаются поодиночке, парами, V- и Y-образно либо в виде палисада. Все морфологические формы способны к истинному ветвлению, особенно на тиогликолевой полужидкой среде. По Граму окрашиваются плохо, часто образуют зернистые либо четкообразные формы, конидий не образуют, не кислотоустойчивы. Все актиномицеты условно делят на 2 группы: высшие, низшие. К высшим относят актиномицеты со стойким мицелием, способным формировать в гифах споры. Среди высших актиномицетов нет патогенных форм. Они являются продуцентами антибиотиков. В отличие от бактерий, спора у актиномицетов служит для размножения. Низшие актиномицеты формируют слабо развитый мицелий, который со временем распадается. Формирование спор не происходит. Среди низших актиномицетов есть патогенные формы, вызывающие актиномикозы у человека и животных (*Actinomyces bovis*, *Actinomyces israelii*).

Представители разных групп актиномицетов обычно хорошо растут на синтетических питательных средах, как на плотных агаризованных, так и на жидких. Их культивируют на агаре Сабуро и глюкозо-кровяном агаре. Можно выращивать на обычном, кровяном, сывороточном МПА, в МПБ, среде Китта-Тароцци, сердечно-мозговом агаре и бульоне. В лабораторных условиях актиномицеты часто поддерживают на овсяном агаре. Хорошими средами для культивирования актиномицетов являются крахмало-аммиачная, среда Гаузе. Развитие микроорганизмов зависит от состава и реакции питательной среды, температурного и воздушного режимов, света, количества и качества посевного материала и других факторов. облигатные и факультативные анаэробы, капнофилы. Растут медленно, посевы следует культивировать 7-14 суток. Температурный оптимум роста  $37^{\circ}\text{C}$ . Некоторые штаммы дают гемолиз на средах с кровью.

Из культуральных показателей для разделения актиномицетов на группы наиболее значима окраска культур – пигментация. По этому признаку актиномицеты делятся на две группы – бесцветные и пигментированные. Первые при росте на питательных средах не образуют никаких красящих веществ. Воздушный мицелий таких актиномицетов может быть белым, светло-серым, кремовым, нижняя сторона колонии бесцветная. Актиномицеты второй группы образуют красящие вещества – пигменты. Колонии их при росте на питательных средах приобретают различную окраску: синюю, фиолетовую, красную, розовую, желтую, оранжевую, зеленую, черную, коричневую. Часто колонии окрашены в смешанные тона.

*Определение общего количества актиномицетов, дрожжеподобных и плесневых грибов.* Вначале делают последовательные 10-кратные разведения свежих фекалий (см. п. 2.1.). После последовательного разведения содержимого кюветки или фекалий на физиологическом растворе в пробирках производят последовательно посев в соответствующие номера чашек Петри со средами для выделения актиномицетов, дрожжеподобных и плесневых грибов согласно п. 3.6. Далее посевы инкубируют и учитывают результаты исследований, как указывалось выше в п. 2.2. и 3.1.

### 3.8. Определение общего количества стафилококков

*Общие сведения.* Стафилококки отнесены (Bergey, Second Edition, Vol. 3, 2009) к: домену *Bacteria*, типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Bacillales*, семей-

ству *Staphylococcaceae*, роду *Staphylococcus*, включающему 36 видов стафилококков. Типичными представителями являются: *S. aureus* (золотистый), *S. epidermidis* (эпидермальный), *S. saprophyticus* (сапрофитический).

Стафилококки – клетки шаровидной формы, диаметром до 1,5 мкм. В препаратах из бульонных культур бактерии располагаются по одному, по два, цепочками, небольшими скоплениями неопределенной формы. В препаратах из агаровых культур могут располагаться довольно характерно в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда (от греч. *Staphylle* – гроздь). Бактерии неподвижны, спор и капсул не образуют, грамположительны, в старых культурах приобретают способность окрашиваться грамтрицательно.

Стафилококки – факультативные анаэробы, но лучше развиваются в аэробных условиях. Хорошо культивируются на простых питательных средах, 35-37°C, рН – 7,2-7,4; лучше – с добавлением к среде глюкозы или крови. Культивируют стафилококки в течение 18-24 часов. Характерное свойство большинства штаммов – способность расти в присутствии 15% NaCl или 40% желчи [4, 17].

На МПА – образуют круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара колонии с гладкой блестящей поверхностью и ровным краем, диаметром 2-5 мм. Стафилококкам присуще пигментообразование, что отчетливо наблюдается при добавлении к среде молочного сахара (10%), а также на картофеле в аэробных условиях, при рассеянном свете. Цвет колоний серый или серо-белый с желтоватым, желто-оранжевым, оранжевым, кремовым или коричневатым оттенком. Цвет пигмента колоний может быть различен у разных штаммов одного и того же вида, поэтому он не является дифференциальным признаком. Колонии имеют грубозернистую структуру с уплотненным центром.

При росте в МПБ вызывают диффузное помутнение среды с образованием на дне пробирки хлопьевидного рыхлого осадка, возможно образование на поверхности бульона серо-белой пленки или пристеночного кольца.

Патогенные штаммы стафилококков образуют на кровяном агаре колонии, окруженные значительной зоной гемолиза. Считают, что кровяной агар является лучшей средой для выделения стафилококков из патматериала. Для приготовления кровяного агара к расплавленному обычному агару, охлажденному до t 45-50°C, прибавляют 5-10% дефибринированной или цельной свежевзятой крови животных. Характерным для стафилококков является то, что они могут расти на средах в присутствии 15-16% NaCl или 40% желчи. Под действием антибиотиков могут превращаться в карликовые и фильтрующиеся формы.

*Определение общего количества стафилококков.* Для определения количества стафилококков в содержимом фекалий вначале делают последовательные 10-кратные разведения свежих фекалий (см. п. 2.1.). После последовательного разведения содержимого кишечника или фекалий на физиологическом растворе в пробирках производят последовательно посев в соответствующие номера чашек Петри со средами для выделения стафилококков согласно п. 3.6. Рекомендуем использовать отечественные питательные среды – желточно-солевой агар Чистовича, молочно-солевой агар или коммерческую среду *Staphylococcus agar* (*Becton Dickinson*). Эти среды обладают селективными свойствами, обусловленными высоким содержанием хлорида натрия, а желточно-солевой агар, кроме того, позволяет более четко, чем кровяной агар, дифференцировать патогенные и непатогенные штаммы стафилококка.

Далее посеvy инкубируют и учитывают результаты исследований, как указывалось выше в п. 2.2 и 3.1.

При видовой идентификации стафилококков учитываются пигмент, способность гемолизировать эритроциты, продуцировать лецитиназу, коагулировать плазму. Характерная пигментация колоний патогенных стафилококков, относя-

щиеся к виду *S. aureus*, определяется при их росте на селективной питательной среде, содержащей высокую концентрацию NaCl (7,5%), маннит в качестве источника углеводов и желатин. Патогенные стафилококки дают на этой среде колонии с желтой пигментацией. Ферментацию маннита определяют путем нанесения на изолированную колонию капли раствора бромтимолового синего (0,04%). В случае смены цвета красителя на желтый реакция считается положительной. На этой же среде возможно определение способности стафилококков сбраживать желатину. Для этого на изолированную колонию наносят каплю 20% водного раствора сульфосалициловой кислоты (реакция *Stone*). В случае положительной реакции через 10 минут вокруг колонии появляется прозрачная зона.

Для подтверждения принадлежности бактерий к виду *S. aureus* проводятся тесты на выявление плазмокоагулазы и ДНК-азы. ДНК-азная активность выявляется на среде *DNA agar (Oxoid)* путем пересева материала из подозрительных колоний штрихами от центра к краю чашки. После инкубирования нуклеазная активность стафилококков выявляется при нанесении на среду красителя толуидинового синего (0,1%), при этом вокруг колоний, образованных *S. aureus*, появляется зона порозовения среды. Для подтверждения принадлежности стафилококков к виду *S. aureus* можно также воспользоваться идентификационными системами Staphslide-Test (BioMerioux), принцип работы которых основан на агглютинации эритроцитов, сенсibilизированных человеческим фибриногеном. Биохимическая идентификация стафилококков проводится при помощи тест-систем API 20 Staph и RAPIDEC staph (BioMerioux).

### **3.9. Определение общего количества аэробных микробов (микробного числа) в 1 г исследуемого материала методом серийных разведений на физрастворе с последующим высевом в чашки Петри с МПА**

Возможно использовать материалы предыдущих исследований, чтобы выполнить подсчет всех видов микроорганизмов – кишечных палочек, бацилл, лакто- и бифидобактерий, затем вычислить процентное соотношение каждого вида микроорганизмов по отношению к микробному числу.

Для ускорения выполнения работы можно сделать десятикратные разведения микробной взвеси из свежих фекалий на физрастворе и выполнить параллельно этапы 4.1 и 4.4. Для этого с 4-й пробирки в разведении 1:10<sup>4</sup> до десятой пробирки 1:10<sup>10</sup> брать по 1 мл исходной микробной взвеси и высевать в ряды чашек Петри с агаром Эндо (для учета роста кишечных палочек) и в ряды чашек Петри с 3% МПА (для учета общего микробного числа). Далее посеvy инкубируют и учитывают результаты исследований, как указывалось выше в п. 2.2 и 3.1.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Бабина, М. П. Иммунология цыплят-бройлеров в онтогенезе и профилактика иммунной недостаточности, желудочно-кишечных болезней бактериальными препаратами : монография. – Витебск, 2001. – 114 с.
2. Бактероиды и бактериозы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vse-zabolevaniya.ru/mikrobiologija/bakteroidy-bakteridozy.html>. – Дата доступа: 12.12.2016.
3. Бактерии рода *Lactobacillus* : общая характеристика и методы работы с ними : учебно-методическое пособие / авт.-сост.: Д. Р. Яруллина, Р. Ф. Фахруллин ; Институт фундаментальной медицины и биологии. – Казань : Казанский университет, 2014. – 51 с.

4. Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология : учебное пособие для студентов медицинских вузов / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Широков. – 2-е изд., стер. – Москва : Академия, 2006. – 462 с.
5. Газиумарова, Л. Д. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника : инструкция по применению : утв. Главным государственным санитарным врачом РБ 19 марта 2010 г. / Л. Д. Газиумарова, Л. П. Титов, Н. Л. Клейко ; ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница г. Минска». – Минск, 2010. – 17 с.
6. Интизаров, М. М. Микрофлора тела животных [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.allvet.ru/articles/article58.php>. – Дата доступа: 13.01.2017.
7. Кишечная микробиота : современные представления / Е. М. Булатова [и др.] // Педиатрия. – 2009. – Т. 87, № 3. – С. 104–111.
8. Классификация возбудителей инфекционных болезней бактериальной этиологии : учебно-методическое пособие для преподавателей, сотрудников НИИ, ветеринарных работников, студентов и слушателей факультета повышения квалификации и студентов, обучающихся по специальности «Ветеринарная медицина», «Ветеринарная санитария и экспертиза» / В. Н. Алешкевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2013 – 84 с.
9. Клостридии (Clostridium) [Электронный ресурс]. – <http://www.gastroscan.ru/handbook/118/3308>. – Дата доступа: 12.12.2016.
10. Клостридии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://medstud.narod.ru/med/infect/clostridium.html>. – Дата доступа: 12.12.2016.
11. Пилуй, А. Ф. Бактериоценоз кишечного тракта новорожденных телят в норме и при кишечных расстройствах / А. Ф. Пилуй, Г. Л. Дворкин // Ветеринарная наука – производству : межведомственный сборник / Бел. НИИЭВ. – Минск, 1986. – Вып. 24. – С. 40–44.
12. Применение пробиотических препаратов на основе метаболитов бацилл для сельскохозяйственных животных и птиц : рекомендации / П. А. Красочко [и др.] ; Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. – Горки, 2010. – 37 с.
13. Рабочая тетрадь по микробиологии [Электронный ресурс] / Челябинская государственная медицинская академия. – Челябинск, 2006. – Ч. 2. – 67 с. – Режим доступа: <http://www.studfiles.ru/preview/2783024/page:3>. – Дата доступа: 12.12.2016.
14. Рекомендации по изучению микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных : рекомендации / П. А. Красочко [и др.] .]. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 20 с.
15. Сидоров, М. А. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками / М. А. Сидоров, В. В. Субботин, Н. В. Данилевская // Ветеринария. – 2001. – № 11. – С. 17–21.
16. Сорокин, В. В. Нормальная микрофлора кишечника животных / В. В. Сорокин, М. А. Тимошко, А. В. Николаева. – Кишинев : Штиинца, 1973. – 77 с. : табл.
17. Справочник по бактериологическим методам исследований в ветеринарии / сост.: А. Э. Высоцкий, З. Н. Барановская. – Минск : Белтаможсервис, 2008. – 824 с.
18. Субботин, В. В. Нормальная кишечная микрофлора и ее становление у собак / В. В. Субботин, Н. В. Данилевская // Восьмой Международный конгресс по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных, Москва, 6–8 апреля 2000 : материалы. – Москва, 2002. – С. 75–77.
19. Тимошко, М. А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных / М. А. Тимошко, И. Г. Пивняк. – Кишинев : Штиинца, 1990. – 191 с.
20. Шнейберг, Я. И. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных / Я. И. Шнейберг, Т. В. Никодимов. – Кишинев, 1990. – 239 с.
21. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [Electronic resource] / G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. – Second Edition. – New York ; Berlin ; Heidelberg, 2005. – Vol. 2 : The Proteobacteria, Part B : The Gammaproteobacteria. – Mode of access: [http://books.google.by/books/about/Bergey's\\_Manual\\_of\\_Systematic\\_Bacter.htm?id=5zSYmcq0GdG&redir\\_esc=y](http://books.google.by/books/about/Bergey's_Manual_of_Systematic_Bacter.htm?id=5zSYmcq0GdG&redir_esc=y). – Date of access: 17.03.2013.
22. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [Electronic resource] / P. D. Vos [et al.]. – Second Edition. – New York ; Berlin ; Heidelberg, 2009. – Vol. 3 : The Firmicutes. – Mode of access: [http://www.bergeys.org/outlines/bergeys\\_vol\\_3\\_roadmap\\_outline.pdf](http://www.bergeys.org/outlines/bergeys_vol_3_roadmap_outline.pdf). – Date of access: 17.03.2013.

Нормативное производственно-практическое издание

**Алешкевич** Виталий Николаевич,  
**Субботина** Ирина Анатольевна,  
**Красочко** Петр Альбинович и др.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖИВОТНЫХ В НОРМЕ И ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ**

### **РЕКОМЕНДАЦИИ**

Ответственный за выпуск А. А. Вербицкий  
Технический редактор Е. А. Алисейко  
Компьютерный набор А. К. Глод  
Компьютерная верстка Е. А. Алисейко  
Корректор Т. А. Драбо

Подписано в печать 08.06.2017. Формат 60x84 1/16.  
Бумага офсетная. Печать ризографическая.  
Усл. п. л. 2,50. Уч.-изд. л. 2,69. Тираж 100 экз. Заказ № 1689.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»  
государственная академия ветеринарной медицины».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.

ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.

Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.

Тел.: (0212) 51-75-71.

E-mail: rio\_vsavm@tut.by

<http://www.vsavm.by>

ISBN 978-985-512-991-3

