

УДК 612.336

КОМПЛЕКСНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДУ МІКРОФЛОРИ КИШКОВИКА ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

М. В. Камінська

Інститут біології тварин НААН
вул. В. Стуса, 38; м. Львів, 79034, Україна; e-mail: marta_kaminska@ukr.net

Описано методику визначення якісного та кількісного складу мікрофлори вмісту кишкового лабораторних тварин, зокрема білих щурів. Метод дозволяє паралельно визначати різні групи мікроорганізмів у одній пробі вмісту кишкового та за 4 доби отримати повну картину стану мікробоценозу, що дає змогу судити про здоров'я тварин, дисбіотичні порушення у складі мікрофлори кишкового та корекцію їх пробіотичними препаратами.

Ключові слова: метод, мікрофлора кишкового, щурі.

За проведення досліджень щодо вивчення впливу пробіотичних препаратів на відновлення складу мікробоценозу кишкового тварин за умов експериментального дисбактеріозу, важливе значення має визначення якісного та кількісного складу мікрофлори вмісту кишкового лабораторних тварин, зокрема білих щурів. Єдиної загальної методики встановлення цього складу не існує. Нормативними документами встановлюються методи кількісного визначення вмісту окремих груп мікроорганізмів [1–4], наприклад, кишкової палички, стафілококів, протею, патогенних ентеробактерій. Проте у дослідницькій роботі необхідно паралельно визначати різні групи мікроорганізмів у одній пробі вмісту кишкового для встановлення загальної картини порушень чи корекції складу мікробоценозу кишкового лабораторних тварин.

Метою роботи була розробка й представлення узагальнюючої методики встановлення якісного та кількісного складу мікрофлори вмісту кишкового білих лабораторних щурів.

Підготовка посуду та елективних середовищ. Для кожної проби необхідно підготувати стерильний бюкс (для внесення проби вмісту кишкового масою 1 г), стерильну скляну паличку, 7 стерильних шпатель, 3 стерильні пробірки, стерильні піпетки на

1 мл (6 шт.) та на 10 мл (для приготування розведень), 8 стерильних чашок Петрі.

Увесь посуд стерилізують у паровому стерилізаторі впродовж 30 хвилин за тиску 0,75 атм. та температури 120 °С.

Елективні середовища готують і стерилізують згідно інструкції від виробника та розливають у стерильні чашки Петрі. Таким чином готують: 3 чашки із середовищем Ендо, 1 чашку із вісмут-сульфітним середовищем, 1 чашку із середовищем Сабуро, 1 чашку із кров'яним агаром, 1 чашку з агаром Байрд-Паркера. Середовище Блаурока готують напіврідким згідно рецепту [5], розливають у 2 пробірки по 4,5 мл та автоклавують із ватними корками. Попередньо готують стерильні скошені агаризовані середовища Олькеницького та Сімонса (по 10 шт. кожного на одну пробу) для ідентифікації окремих видів ентеробактерій. Пробірки зі скошеним середовищем можна зберігати у холодильнику впродовж 30 діб.

Для мікроскопування препаратів із середовища Блаурока та підозрілих колоній з інших середовищ використовують набір реактивів для фарбування за Грамом та мікроскоп.

Відбір та приготування проби. Проби вмісту кишкового щурів (найчастіше прямої кишки) відбирають безпосередньо після забою. Для цього стерильними ножицями від-

різають ділянку кишковика, вміст якої буде досліджуватись, і поміщають її у стерильну чашку Петрі. Далі, застосовуючи правила асептики, розрізають кишку та виймають вміст. У стерильний бюкс поміщають 1 г вмісту та додають 9 мл стерильного фізіологічного розчину. Таким чином отримують десятикратне розведення (10^{-1}).

Часто трапляється, що у відділі кишковика вмісту менше, ніж один грам, особливо коли працюють із хворими тваринами. Тоді зважують максимально можливу кількість вмісту та перераховують об'єм фізіологічного розчину, який буде внесено у бюкс для отримання розведення у 10 разів. Наприклад, при масі проби 500 мг вносимо 4,5 мл розчину, при масі 300 мг — 2,7 мл розчину.

Бюкси із пробами не зберігають, а відразу використовують для засівання середовищ. Перед приготуванням розведень вміст бюкса ретельно перемішують стерильною склянкою паличкою.

Приготування та висівання розведень.

Для приготування необхідних розведень використовують три стерильні пробірки, у які вносять по 9,9 мл стерильного фізіологічного розчину.

Із бюкса стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл розчину та переносять у пробірку № 1 із 9,9 мл фізіологічного розчину, струшують. Таким чином отримуємо розведення 10^{-3} . Переносячи із цієї пробірки 0,1 мл розчину в наступну пробірку (пробірка № 2), отримують розведення 10^{-5} і так далі згідно схеми (рис. 1).

Після приготування усіх розведень із кожної пробірки стерильною піпеткою відбирають по 0,1 мл розчину та вносять у чашку Петрі з відповідним елективним середовищем, збільшуючи кожне розведення ще у 10 разів. Розчин розтирають по поверхні стерильним шпателем до повного його поглинання агаром. У пробірки із середовищем Блаурока вносять по 0,5 мл розчину з певним розведенням, при цьому ступінь розведення зростає на порядок.

Так, згідно схеми (див. рис. 1), із бюкса відбирають по 0,1 мл розчину і вносять у чашки Петрі із середовищем Ендо та вісмут-сульфітним агаром, отримуючи розведення 10^{-2} . Із пробірки № 1 по 0,1 мл вносять у чашки із середовищами Ендо, кров'яним агаром, агаром Байрд-Паркера та Сабуро. При

цьому отримують розведення 10^{-4} . Із пробірки № 2 вносять у чашку з середовищем Ендо 0,1 мл розчину та 0,5 мл розчину в пробірку з середовищем Блаурока, отримуючи розведення 10^{-6} . Із пробірки № 3 відбирають 0,5 мл розчину в пробірку з середовищем Блаурока та отримують розведення 10^{-8} .

Залишають засіяні чашки та пробірки на столі на 15 хвилин, після чого ставлять у термостат за температури 37°C . Чашки із середовищами Ендо, кров'яним агаром та вісмут-сульфітним агаром переглядають через 24 години після засіву, чашки із середовищами Байрд-Паркера та Сабуро — через 48 годин, а середовище Блаурока мікроскопують на 4-у добу росту.

Підрахунок та ідентифікація колоній.

Підрахунок колоній проводять на усіх чашках із середовищами. Так, наприклад, якщо на чашці з середовищем Ендо при розведенні 10^{-6} виросло 28 колоній, то загальна кількість кишкової палички становитиме $28 \cdot 10^6$ КУО/г (колонієутворюючих одиниць на грам вмісту кишковика). Виняток складає чашка із середовищем Ендо при розведенні 10^{-2} , на якій фіксують присутність білих або прозорих колоній лактозонегативних ентеробактерій, адже їх чисельність у загальній кількості кишкової палички зазвичай незначна (менше 0,1 %). Підрахунок усіх колоній не проводять.

На середовищі Ендо ростуть ентеробактерії, тому підраховують загальну кількість колоній: темно-червоного кольору з металевим блиском і червоних (штами кишкової палички із нормальною ферментативною здатністю lac^+), рожевих (слабоферментуючі штами lac^{\pm}) та білих колоній (лактозонегативні штами lac^-) із врахуванням ступеня розведення. Типових представників цих груп пересівають на середовища Олькеницького та Сімонса для ідентифікації та підтвердження їх ферментативної активності. Пробірки вміщують у термостат за температури 37°C на 24 години та після цього фіксують наявність певних біохімічних властивостей мікроорганізмів [6].

На чашках із вісмут-сульфітним агаром ідентифікують лактозонегативні ентеробактерії (*Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* та ін.). Для цього підраховують кількість однакових колоній та відсівають їх на середовища Олькеницького та Сімонса для

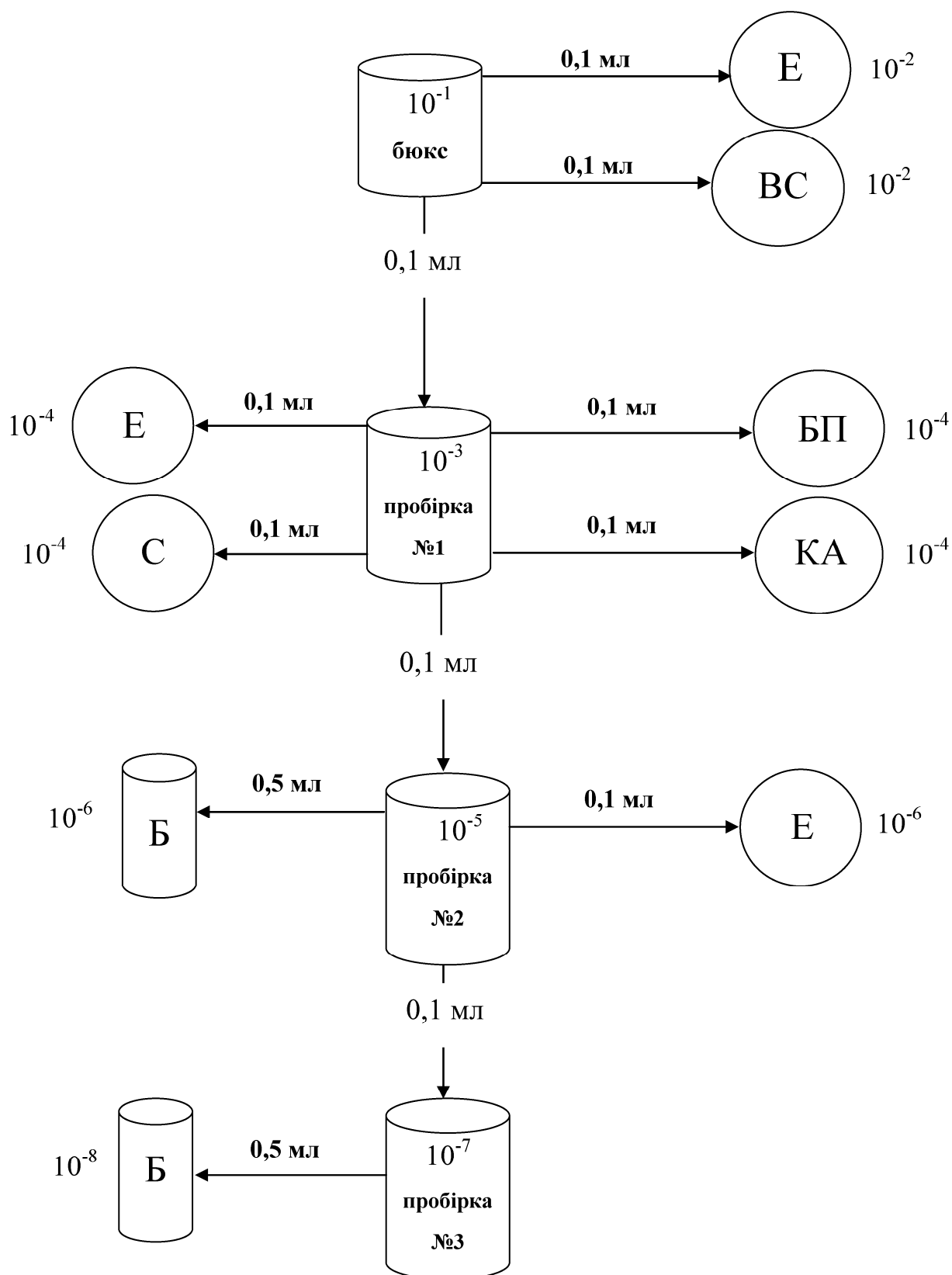


Рис. 1. Схема посіву проби вмісту кишкового щурів на елективні середовища (Е — середовище Ендо, ВС — вісмут-сульфитне середовище, КП — середовище Байрді-Паркера, С — середовище Сабуро, Б — середовище Блаурока).

ідентифікації. Пробірки ставлять у термостат за температури 37 °С на 24 години та після цього також фіксують наявність певних біохімічних властивостей мікроорганізмів [6].

При перегляді чашок із кров'яним агаром відзначають наявність та кількість колоній із зонами лізису (α чи β). Для ідентифікації гемолізуючих штамів мікроорганізмів готують фіксовані препарати на предметних скельцях та після фарбування за Грамом мікроскопують. При цьому виявляють гемолізуючі стрептококи, стафілококи, ентеробактерії.

Через 48 годин після посіву на середовищі Байрд-Паркера штамми стафілококів утворюють чорні колонії. Рахують їх загальну кількість та окремо фіксують колонії із «хмаркою» (патогенні штамми). Усі нетипові колонії висівають на середовища Олькеницького та Сімонса для ідентифікації. Пробірки ставлять у термостат за температури 37 °С на 24 години та після цього фіксують наявність певних біохімічних властивостей мікроорганізмів [6].

Переглядаючи чашки із середовищем Сабуро, виявляють присутність та підраховують молочно-білі колонії дріжджоподібних грибків роду *Candida*.

На четверту добу росту з пробірок із середовищем Блаурока стерильною мікробіологічною петлею відбирають краплю осаду на предметне скельце та готують фіксований препарат. Фарбують його за Грамом та мікроскопують у краплі гліцерину. Фіксують наявність синіх паличок лактобактерій та червоних або синіх Y- та V-подібних клітин біфідобактерій у пробірках певного розведення.

Зведення результатів досліджень. Усі результати досліджень зводять у загальну таблицю (табл. 1). При цьому загальна кількість клітин кишкової палички *E. coli* складається з сумарної кількості штамів із нормальною ферментативною активністю («металеві» та червоні колонії на середовищі Ендо), слабоферментуючих штамів (рожеві колонії на середовищі Ендо) та лактозонегативних штамів (білі безбарвні колонії на середовищі Ендо). Кількість слабоферментуючих та лактозонегативних штамів кишкової палички розраховується у відсотках від загальної кількості кишкової палички.

Таблиця 1. Склад мікрофлори вмісту кишкового шурів

| Мікроорганізми | Проба |
|--|--------------------------|
| Загальна кількість <i>E. coli</i> | 10^6 – 10^8 КУО/г |
| – нормальноферментуючі (lac^+) штамми | >75 % |
| – слабоферментуючі (lac^\pm) штамми | <25 % |
| – лактозонегативні (lac^-) штамми | 10^2 КУО/г |
| Гемолізуючі штамми | 10^4 КУО/г |
| Ентеробактерії (lac^-) | 10^2 – 10^3 КУО/г |
| Стафілококи | 10^4 – 10^6 КУО/г |
| – від загальної кількості мікроорганізмів | <25 % |
| – з них патогенні штамми | <10 % |
| Біфідобактерії | 10^8 – 10^{10} КУО/г |
| Лактобактерії | 10^6 – 10^8 КУО/г |
| Гриби роду <i>Candida</i> | 10^4 – 10^5 КУО/г |

Кількість гемолізуючих штамів визначається кількістю колоній із зонами гемолізу (α чи β) на кров'яному агарі. При цьому за результатами мікроскопії та біохімічних показників вказується, штамми яких саме мікроорганізмів спричинили гемоліз (стрептококи, стафілококи, ентеробактерії).

Загальна кількість стафілококів визначається за кількістю чорних колоній на середовищі Байрд-Паркера, а у відсотковому показнику вказується кількість патогенних штамів.

Щодо основних представників мікрофлори кишкового шурів — лактобактерій та біфідобактерій — їх кількість визначається максимальним розведенням, за якого фіксується присутність клітин мікроорганізмів цих груп у приготованих для мікроскопії препаратах. Так, якщо зафіксовано під мікроскопом біфідобактерії у препаратах з розведень 10^{-6} та 10^{-8} , то кінцевим є результат 10^8 КУО/г. Якщо у розведенні 10^{-6} клітини присутні, а в розведенні 10^{-8} їх не спостерігаємо, то кінцевим буде показник 10^6 КУО/г.

Кількість клітин дріжджоподібних грибів *Candida* встановлюється на середовищі Сабуро.

Лактозонегативні ентеробактерії прописуються окремим рядком із вказанням роду мікроорганізму (*Proteus*, *Citrobacter*, *Salmonella* чи інші), що встановлюється за результатами визначення біохімічних властивостей штамів на середовищах Олькеницького та Сімонса із використанням таблиць властивостей [6].

Оцінювання результатів. Визначення якісного та кількісного складу мікрофлори кишковика лабораторних тварин дає змогу судити про здоров'я тварин, дисбіотичні порушення у складі мікрофлори кишковика та корекцію їх пробіотичними препаратами.

Так, за норми у лабораторних щурів, згідно наших досліджень [7–11], загальна кількість кишкової палички перебуває в межах 10^6 – 10^8 КУО/г, при цьому кількість слабоферментуючих штамів не перевищує 25 %. Зустрічаються поодинокі лактозонегативні штами. Серед гемолізуючих мікроорганізмів переважають представники стафілококів, стрептококів та кишкової палички. Кількість стафілококів визначається у межах 10^4 – 10^6 КУО/г, а чисельність патогенних штамів не перевищує 10 % від загальної кількості кокових форм. Найчисельніша група мікроорганізмів — це біфідобактерії та лактобактерії, що загалом складають близько 99 % загальної кількості мікроорганізмів у кишковикі щурів. Їхня кількість сягає 10^8 – 10^{10} КУО/г для біфідобактерій та 10^6 – 10^8 КУО/г для лактобактерій. Зменшення їх кількості на два порядки (у 100 разів) на фоні зростання кількості умовно-патогенних груп бактерій свідчить про виникнення серйозного дисбактеріозу кишківника. Кількість грибів роду *Candida* коливається у межах 10^4 – 10^5 КУО/г. Зростання їх кількості на порядок чи більше вказує на виникнення грибкового дисбактеріозу. Про виникнення протейного дисбактеріозу свідчить зростання кількості клітин протейою із 10^2 – 10^3 КУО/г до 10^4 – 10^5 КУО/г. Загальна кількість інших лактозонегативних умовно-патогенних ентеробактерій коливається в межах 10^2 – 10^3 КУО/г.

Також слід зауважити, що за вивчення складу мікрофлори кишківника лабораторних щурів, яким згодують пробіотичні добавки, прогнозується зростання загальної кількості біфідо- та лактобактерій, тому необхідно зробити додаткове розведення (пробір-

ка № 4) та засіяти середовище Блаурока із розведенням 10^{-10} . За моделювання дисбактеріозу введенням антибіотиків передбачаємо зменшення загальної кількості кишкової палички чи стафілококів (залежно від типу антибіотика) та біфідо- і лактобактерій. Тому посів на елективні середовища для цих видів мікроорганізмів необхідно робити при менших розведеннях.

Таким чином, нами запропоновано комплексну методику визначення складу мікробіоценозу кишковика лабораторних тварин, що загалом займає 4 доби, однак дає можливість визначити якісний та кількісний склад мікрофлори вмісту прямої кишки щурів і діагностувати його порушення.

1. ДСТУ EN 12824:2004. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення *Salmonella*.

2. ДСТУ ISO 4831:2006. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови щодо підрахування кількості колиформних мікроорганізмів. Методика найвірогіднішої кількості.

3. ДСТУ ISO 6888-1:2003. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахування коагулазопозитивних стафілококів (*Staphylococcus aureus* та інших видів). Частина 1. Метод з використанням агарового середовища Беард-Паркера.

4. ДСТУ ISO 16654:2009. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення *Escherichia coli* 0157.

5. Гончарова Г. И. К методике культивирования *B. bifidum* / Г. И. Гончарова // Лабораторное дело. — 1968. — № 2. — С. 100–102.

6. Красноголовец В. Н. Дисбактериоз кишечника / Красноголовец В. Н. — М. : Медицина, 1989. — 208 с.

7. Камінська М. В. Зміни у видовому складі мікробіоценозу кишковика щурів при згодюванні біомаси дріжджів *Sacharomyces cerevisiae* та *Phaffia rhodozyma* / М. В. Камінська // Біологія тварин. — 2007. — Т. 9, № 1–2. — С. 199–202.

8. Вплив каротиновмісної біомаси дріжджів та β -каротину на склад мікрофлори та імунний статус щурів / М. В. Камінська, Г. І. Нечай, Н. І. Цепко, Г. В. Колісник // Біологія тварин. — 2008. — Т. 10, № 1–2. — С. 261–265.

9. Порівняльна характеристика впливу біомаси каротиносинтезуючих дріжджів та каротину на мікрофлору кишечника щурів за умов оксидативного стресу / Камінська М. В., Колісник Г. В., Нечай Г. І., Гураль С. В. // Сучасні проблеми ветеринарної медицини : зб. наук.

праць Міжнародної науково-практичної конференції, серія «Ветеринарна медицина». — Вип. 3. — Кам'янець-Подільський, 2008. — С. 25–28.

10. Використання селеновмісної біомаси нових штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для корекції складу мікрофлори кишечника щурів / [М. В. Камінська, Г. І. Нечай, Н. І. Борецька

та ін.] // Науково-технічний бюлетень ІБТ і ДНДКІВКД. — 2008. — Вип. 9, № 3. — С. 213–218.

11. Камінська М. В. Вплив тетрахлорметану на склад мікробіоценозу кишечника щурів / М. В. Камінська // Науково-технічний бюлетень ІБТ і ДНДКІВКД. — 2008. — Вип. 9, № 4. — С. 304–308.

КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

М. В. Каминская

Институт биологии животных НААН, г. Львов

Описано методику определения качественного и количественного состава микрофлоры содержимого кишечника лабораторных животных, а именно белых крыс. Метод позволяет параллельно определять различные группы микроорганизмов в одной пробе вестимого кишечника и на протяжении 4 суток получить полную картину состояния микробиоценоза, что даёт возможность судить о здоровье животных, дисбиотических нарушениях в составе микрофлоры кишечника и коррекции их пробиотическими препаратами.

Ключевые слова: метод, микрофлора кишечника, крысы.

THE COMPLEX METHOD FOR DETERMINATION OF INTESTINAL MICROFLORA COMPOSITION OF LABORATORY ANIMALS

M. V. Kaminska

Institute of Animal Biology, NAAS, Lviv

The method of determination of qualitative and quantitative composition of intestinal microflora of laboratory animals, namely albino rats, was described. The method allows to simultaneously identify different groups of microorganisms in one sample of intestinal composition and to get a full picture of microbocenosis within 4 days that allows to consider animal's health, dysbiotic infringement in intestinal microflora composition and its correction with probiotic preparations.

Key words: method, intestinal microflora, rats.