

УДК 579.64

ПОДБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* ИЗ РУБЦА И ТОЛСТОЙ КИШКИ ТЕЛЯТ МОЛОЧНОГО ПЕРИОДА

*Ломакин А.А., магистрант 1 курса ФВМиБ,
artemy.lomakin@yandex.ru*

*Научные руководители: Улитико В.Э., доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ,
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

Ключевые слова: выделение, идентификация, рубец, толстая кишка, *Lactobacillus spp.*

*Работа посвящена изучению подбору питательных сред для выделения, количественного определения бактерий рода *Lactobacillus* из содержимого рубца и толстой кишки телят молочного периода. По результату проведенной работы установлено, что наиболее подходящими средами является среда Лактобакагар.*

Цель работы: подбор питательной среды для выделения и идентификации, определение количественного состава бактерий рода *Lactobacillus* в рубце и толстой кишки телят молочного периода.

В работе использованы штаммов музея кафедры МВЭВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГАУ»: *L. acidifarinae-7*.

Оборудование: микроскоп БИОМЕД 6 № 4F 8663200/01, эксикатор тринокуляр с видеонасадкой и программным обеспечением; термостат ТС-80М-2.

Для оценки роста на различных средах их культивировали при температуре 36-37°C: агар бактериологический (ТMedia, Индия), Бифидум-среда (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск); Лактобакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск); питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск), агар МакКонки с хлоридом натрия, солями желчных кислот и лактозой (ТMedia, Индия), питательная среда для свыведения сальмонелл сухая-висмут-сульфит агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), питательная среда для индификации энтеробактерий ацетатный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), агар Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), агар Клигlera-ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), среда Симмонса (Биокомпас-С, Углич) среда Кристенсена (Биокомпас-С, Углич), среда

Левина-ГРМ(ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), среда Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), бифидум-среда(ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), соль NaCl.

В процессе эволюционного развития пищеварительный тракт жвачных животных, в том числе крупного рогатого скота, приспособился к переработке большого количества грубого растительного корма, в состав которого входит клетчатка. По сути рубец является большой «бродильной установкой». В этом отделе в огромных количествах живут разнообразные микроорганизмы, вызывающие процессы брожения, которые протекают в условиях нейтральной или слабощелочной реакции [1,4].

Благодаря различной по своему видовому составу микрофлоре (более 60 видов бактерий) и ее обилию в рубце, происходит сбраживание основных питательных веществ корма – углеводов, белков и липидов и создаются условия для последующего их эффективного использования в нижележащих отделах пищеварительного тракта [2,3].

Одной из бактерий микрофлоры рубца являются микроорганизмы рода *Lactobacillus*. Они обладают высокой биологической активностью, что определяет их практическое использование в качестве пробиотиков и входят в состав пищевых продуктов [6]. Молочнокислые бактерии являются важной составляющей нормальной микрофлоры пищеварительного и генитального тракта млекопитающих. Немаловажным аспектом является изучение меж штаммовых взаимодействий бактерий рода *Lactobacillus*. Антагонистические свойства молочнокислых бактерий обусловлены продукцией органических кислот (молочной, уксусной), пероксида водорода и образованием субстанций, схожих с антибиотиками. По мнению ряда исследователей, именно образование указанных органических кислот из углеводов приводит к снижению pH среды и это один из факторов, предотвращающих развитие других микроорганизмов [7].

Состав микрофлоры рубца КРС представлен видами лактобацилл -*Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. fermenti*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *Lactobacillus viridescens*, *L. delbrueckii* [14].

Бактерии рода *Lactobacillus* факультативные анаэробы; рост поверхности на твердых средах, как правило, усиливается анаэробными условиями или с пониженным содержанием кислорода и содержанием CO₂ 5-10%. Строго аэробные условия обычно являются ингибитором роста[9].

Микроорганизмы требовательны к питательным субстратам таким как: аминокислотам, пептидам, производные нуклеиновой кислоты, витаминам, солям, жирным кислотам или сложных эфирам и

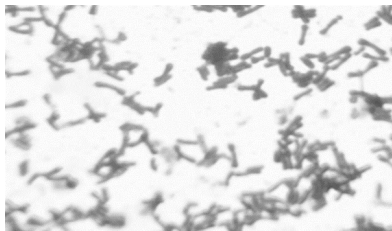


Рисунок 1 - Окраска по Грамму бактерий *L. acidifarinae* штамм *L.acid* -7 с бифидум-среда, при температуре культивирования 37°C через 24 часа

жирными кислотам, способен к сбраживанию углеводов. Питательные требования, как правило, характерны для каждого вида бактерий по возможности для конкретного штамма [5,10,11,12].

Диапазон температур роста 2-53°C, оптимальный в целом 30-40°C. Оптимальный обычно 5,5-6,2(кислотный). Рост происходит при pH=5,0 или менее, темп роста уменьшается при нейтральных или щелочных условиях [8,9].

Собственные исследования. При помощи метода окраски по Грамму (Лабинская А.С,1984) *L. acidifarinae* грамположительные палочковидные микроорганизмы (Рисунок 1).

Для подбора оптимальных сред для идентификации микроорганизмов *B. L. acidifarinae* культивировали на питательных средах, как накопления, так и на дифференциально- диагностических. Все культуры микроорганизмов культивировали в термостате при температуре 37°C, аэробных условиях, так и в условиях с повышенном содержанием углекислого газа Для этого использовали эксикатор для выращивания на плотных питательных средах, на жидких и полужидких питательных средах сверху вносили вазелиновое масло. Для исследования культуры пересеивали с МПБ и лактобакагара. Посевы на плотные были произведены по методу Дригальского. Бактерии, *L. acidifarinae* не растут на МПА и МПБ в течении 48 часов культивирования при температуре 37°C.

Для штамма микроорганизма *L. acidifarinae* был характерный рост на лактобакагара в течении 48 часов культивирования при температуре 37°C. Колонии были 2-4 мм в диаметре, серо-белого, с неровным краем, выпуклые, глянцевые.

На среде Кесслера через 72 часа при температуре 37°C рост с изменением цвета среды, без газообразования. На среде Кристенсена

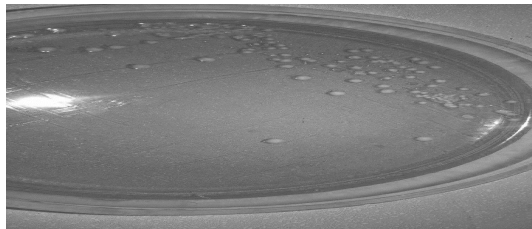


Рисунок 2 - Рост микроорганизмов штамма бактерий *L. acidifarinae-7* на лактобакагаге при 37°C через 72 часа в термостате(аэробных условия)

с мочевиной и среде Симмонса при тех же условиях был слабый рост по месту укола. Из-за отсутствия смены цвета сред можно заключить, что не один из изученных микроорганизмов не обладает способностью ферментировать моче. На среде бифидум растут с слабым помутнением среды.

На дифференциально-диагностических средах, таких как среда Эндо, Висмут-сульфит агар, среда Левина, Плоскирева, МакКонки, Симмонса, ацетатный агар, желточно-солевой агар, роста через 72 часа культивирования при температуре 37°C не было.

Так же дополнительно проведено исследование биохимической активности бактерий видов *L. acidifarinae* при использовании малого ряда сред Гисса. Результаты представлены в таблице 1. Было проведено при 37°C в течении 72 часа. Все пробы культивировались под слоем вазелинового масла, что позволило создать оптимальные условия.

Таблица 1 - Результат исследования биохимической активности бактерий видов *L. acidifarinae* при 37°C в течении 72 часа

	<i>L.acidifarinae</i>
Лактоза	+
Глюкоза	+
Манноза	±
Мальтоза	+
Раффиноза	+

+ -выреженная биохимическая активность; ± -варьирующий результат биохимической активности; - отсутствие биохимической активности.

В результате изучения данных свойств установлено, что наиболее подходящая среда для выделения бактерий рода *Lactobacillus* является Лактобакгагар, так как в состав среды входят в достаточной концентрации питательные вещества, и в составе так же входит ацетат натрия в качестве ингибитора посторонней микрофлоры. Бактерии штамма *L. acidifarinae* обладают биохимической активностью. Так у данного микроорганизма выявлена сахаролетическая активность по отношению: к лактозе, мальтозу, маннозе, раффинозе и глюкозе.

Полученные данные будут использованы в дальнейшей работе для выделения и идентификации бактерий рода *Lactobacillus* из рубца и толстой кишки телят.

Библиографический список

1. Алешкевич В. Н. и др. Определение микробиоценоза кишечного тракта животных в норме и при дисбактериозах, -2017.
2. Брауде А. Г., Гудкова А. Ю. Состав биоценоза рубца крупного рогатого скота в возрастном аспекте в пастбищный период //Российский паразитологический журнал. – 2013. – №. 4.
3. Домотенко Л. В., Шепелин А. П., Морозова Т. П. Питательные среды для основных представителей нормофлоры кишечника //Бактериология. – 2016. – Т. 1. – №. 1. – С. 48-53
4. Дускаев Г.К. Течение преджелудочного пищеварения у бычков мясной породы в зависимости от типа кормления // Вестник мясного скотоводства, вып. 56. 2003. С. 230-233
5. Лысенко Ю. А. и др. Подбор оптимальной питательной среды для культивирования, концентрирования и высушивания клеток *Lactobacillus acidophilus* //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – №. 102.
6. Соловьева И. В. и др. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* //Вестник Нижегородского университета им. НИ Лобачевского. – 2010. – №. 2-2.
7. Яруллина Д. Р., Фахруллин Р. Ф. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними //Казань: Казанский университет. – 2014. – С. 51.
8. Anzengruber J. et al. *Lactobacillus buchneri* S-layer as carrier for an Ara h 2-derived peptide for peanut allergen-specific immunotherapy //Molecular immunology. – 2017. – Т. 85. – С. 81-88.
9. de Mesquita A. R. C. et al. Metabolism and physiology of *Lactobacilli*: a review // JEAP. – 2017. – Т. 2. – №. 2. – С. 125-136.

10. Ganesh B. P. et al. Diacylglycerol kinase synthesized by commensal *Lactobacillus reuteri* diminishes protein kinase C phosphorylation and histamine-mediated signaling in the mammalian intestinal epithelium // *Mucosal immunology*. – 2017.
11. Ingham S. C. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products // *Journal of food protection*. – 1999. – Т. 62. – №. 1. – С. 77-80.
12. Manzoor A. et al. Significantly enhanced biomass production of a novel biotherapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy // *Journal of biological engineering*. – 2017. – Т. 11. – №. 1. – С. 17.
13. Oberg C. J. et al. *Lactobacillus wasatchensis* sp. nov., a non-starter lactic acid bacteria isolated from aged Cheddar cheese // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2016. – Т. 66. – №. 1. – С. 158-164.
14. Yu X. et al. A comparative characterization of different host-sourced *Lactobacillus ruminis* strains and their adhesive, inhibitory, and immunomodulating functions // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Т. 8. – С. 657.

SELECTION OF THE NUTRIENT ENVIRONMENT FOR THE IDENTIFICATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA OF THE GENUS *LACTOBACILLUS* FROM THE RUBBER AND COLON OF BREAST DAUNTS

Lomakin A.A., Ulitiko V.E., Vasiliev D.A..

Key words: *isolation, identification, scar, colon, Lactobacillus spp.*

*The work is devoted to the study of the selection of nutrient media for the isolation, quantification of bacteria of the genus *Lactobacillus* from the contents of the rumen and colon of the calves of the milk period. According to the results of the work carried out, it is established that the most suitable medium is the *Lactobacagar* medium.*