

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**ВИЗНАЧЕННЯ ЯКІСНИХ І КІЛЬКІСНИХ ПОКАЗНИКІВ МІКРОБІОТИ
КИШЕЧНИКА ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН
ДЛЯ ОЦІНЮВАННЯ ВПЛИВУ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН ЗА
НЕЗБАЛАНСОВАНОГО РАЦІОНУ**

(науково-практичні рекомендації)

Дніпро, 2024

УДК 619:611.34:636.92

Рекомендовано вченою радою
Дніпровського державного аграрно-економічного університету
(протокол № 4 від 19 грудня 2024 р)

Рецензенти:

Сосницький О. І. – доктор ветеринарних наук, професор кафедри інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Іовенко А.В. – кандидат ветеринарних наук, доцент, в.о. завідувача кафедри ветеринарної медицини та гігієни Миколаївського національного аграрного університету.

Білан М. В., Лещова М. О. Визначення якісних і кількісних показників мікробіоти кишечника лабораторних тварин для оцінювання впливу лікарських рослин за незбалансованого раціону: науково-практичні рекомендації. Дніпро, 2024. 30 с (1.5 д.а).

У науково-практичних рекомендаціях наведено схему і методику визначення якісних і кількісних показників мікробіоти кишечника, наведено приклади типових представників мікрофлори, їх морфологічні і культуральні властивості, представлені власні результати вивчення показників якісного і кількісного складу мікробіоти кишечника лабораторних тварин за впливу лікарських рослин на тлі незбалансованого (високожирового) раціону. Наведені результати досліджень мають практичну цінність у розширенні знань про якісний і кількісний склад мікробіоти кишечника залежно від факторів навколишнього середовища.

Для наукових співробітників, викладачів та здобувачів у галузі ветеринарної медицини, біотехнології та біології.

Дослідження фінансувалося Міністерством освіти і науки України,
грант № 0122U000975.

© М. В. Білан, 2024

© М. О. Лещова, 2024

© Дніпровський державний аграрно-економічний університет, 2024

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Методика дослідження	5
1.1. Утримання тварин, раціон, схема досліджень.....	5
1.2. Бактеріологічні дослідження.....	5
1.3. Інтерпретація результатів дослідження.....	8
Основні представники нормальної мікрофлори кишечника	
2 тварин.....	14
Якісні і кількісні показники мікробіоти кишечника щурів за	
3 впливу лікарських рослин на тлі незбалансованого раціону.....	24
Висновки.....	27
Література.....	29

ВСТУП

Організм тварин заселений різноманітною мікрофлорою: бактеріями, грибами, археями протистами та вірусами, які разом відомі як мікробіота. Деякі з цих організмів є корисними для тварини-господаря, деякі не мають встановленого корисного чи шкідливого впливу. Однак за певних умов вважається, що деякі види здатні викликати захворювання, спричиняючи інфекцію.

Відомо, що у кишечнику тварин живе від 500 до 1000 видів бактерій, переважна більшість яких – в товстому відділі: 1 г фекалій нараховує мільярди мікробних клітин (за масою близько 40–60 % сухої речовини). Бактерії шлунково-кишкового тракту виконують важливі функції: сприяють травленню, приймають участь у процесах метаболізму, покращують всмоктування поживних речовин, пригнічують ріст потенційно патогенних бактерій і сприяють розвитку імунітету. Кишкова мікробіота здатна розщеплювати певні поживні речовини, наприклад складні неперетравлювані вуглеводи, що сприяє покращенню їх засвоєнню твариною, синтезують вітамін групи В, К і біотин, фолієву кислоту, представники нормальної флори *Lactobacillus* spp. здатні перетворювати лактозу та інші цукри в молочну кислоту в кишечнику, регулюють розвиток кишечника, сприяють виробленню гормонів, які сприяють збереженню жирів в організмі господаря, ін.

Оскільки травний канал тварини пов'язаний з навколишнім середовищем, то в ньому розрізняють нормальну аутофлору – сукупність типових для біологічного виду асоціацій мікроорганізмів. Також є мікроорганізми – сапрофіти, для яких живильним середовищем є проміжні або кінцеві продукти життєдіяльності макроорганізму та симбіонти – організми різних біологічних видів із взаємопов'язаною та взаємовигідною спільною життєдіяльністю.

Аутофлора ділиться на головну (основна, постійна, автохтонна, облигатна, індигенна) та залишкову (додаткова, транзитна, факультативна, аллохтонна).

Представники головної аутофлори на 90% складаються з анаеробів (біфідобактерій, бактероїдів, фузобактерій) та на 9% аеробів (кишкова паличка з повноцінними ферментативними властивостями, лактобактерії, ентерокок). Не більше 1% становить залишкова аутофлора, яка представлена сапрофітами (епідермальний стафілокок, гриби) та умовно-патогенна флора (гемолітичний стрептокок, золотистий стафілокок, грамнегативні палички).

Якісний та кількісний вміст мікробів шлунково-кишкового тракту варіює та залежить від типу годівлі, віку, впливу шкідливих факторів навколишнього середовища, наявності хронічних захворювань тощо. Враховують різницю в методиках проведення лабораторних досліджень: використання неоднакової кількості та типів середовищ, відмінність у способі забору матеріалу, а також відсутності обліку умов зберігання, транспортування проб та ін.

Розподіл мікробів у шлунково-кишковому тракті нерівномірний. У ротовій порожнині мікрофлора багата і різноманітна: стрептококи, стафілококи, ентерококи, гриби, найпростіші та ін.

У однокамерному шлунку мікробів мало або вони зовсім відсутні через бактерицидні властивості соляної кислоти та шлункового соку. Виявляють у незначній кількості стафілококи, стрептококи, грамнегативні бактерії, лактобактерії, сарцини, ентерококи, молочнокислі бактерії, гриби.

У тварин тонкий відділ кишечника практично стерильний через мікробіцидну дію жовчі. Кількість мікробів не перевищує кількох тисяч в 1 мл вмісту тонких кишок (хімусу). Серед мікрофлори тонких кишок зустрічаються кишкова паличка, ентерококи, спори бацил і клостридій.

У новонароджених тварин облігатною флорою товстого відділу кишечника є кишкова та ацидофільна палички. З віком, ця частина кишечника, наповнюється значною кількістю ентерококів, гнільних клостридій, збудників бродіння клітковини, тощо. Останніх мікроорганізмів особливо багато у сліпій кишці коней. Саме вони сприяють засвоєнню грубих кормів. У товстих кишках жуйних тварин також ферменти мікробів сприяють перетравленню до 10–30 % клітковини грубих кормів. У товстому відділі кишечника зустрічаються спори бацил, актиноміцетів і грибів, хвороботворних клостридій, збудники некробактеріозу, паратифів, кампілобактеріозу та інших інфекцій.

Для травоядних тварин характерними є процеси бродіння у кишечнику, оскільки важко перетравлювати, наприклад, сіно. Особливою мікрофлорою для мурчаків, щурів, мишей, кроликів, хом'яків є анаеробна мікрофлора, яка здатна перетравлювати целюлозу, що присутня в сіні. Характер взаємовідносин цих мікроорганізмів може бути різним і насамперед, залежить від особливостей раціону. Тварина при цьому споживає як їжу продукти деградації целюлози, так самі клітини мікроорганізмів. Таким чином спостерігається кооперація, або симбіоз.

За даними Дунаєва та ін. (2012), в господарствах, що спеціалізуються на вирощуванні худоби в Україні, за ентеритів виділено представники родини *Enterobacteriaceae* (47 %), мікроорганізми роду *Staphylococcus* (15 %), *Enterococcus* (5 %) та *Streptococcus* (13 %). При цьому, мікрофлора клінічно здорових тварин була представлена аутохтонними облігатними біфідобактеріями, лактобактеріями, бактероїдами, кишковою паличкою та ентерококами (у 100 % тварин). У тварин, хворих на ентерит, реєстрували збільшення кількості бактероїдів (до $2,2 \times 10^{11}$) і еубактерій (до $5,8 \times 10^8$) на фоні значного зменшення кількості біфідобактерій (від $4,2 \times 10^6$ до повного їх зникнення), лактобактерій (від $2,8 \times 10^7$ до повного їх зникнення) та появою таких бактерій, як *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* та *E. coli* з гемолітичною активністю та слабкими ферментативними властивостями, які не реєстрували у шлунково-кишковому тракту клінічно здорових тварин.

1. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1. Утримання тварин, раціон, схема досліджень

Тварини. У дослідженні впливу лікарських рослин на мікробіоту кишечника використано дорослих білих безпородних лабораторних щурів-самців масою 200 ± 10 г. Щурів утримували в полікарбонатних клітках із сталевими решітчастими кришками і кормовими заглибленнями, по 5 особин у клітці. Температура в приміщенні $20\text{--}22$ °С, відносна вологість повітря $50\text{--}65\%$, світловий режим становив 12 годин світла та 12 годин темряви. Відповідно до режиму, проводили провітрювання.

Раціон. Для досліду був виготовлений високожировий раціон, що включав 15 % рослинної (соняшникової) олії. Основу раціону складала зерносуміш – 75% (кукурудза, насіння соняшника, пшениця, ячмінь), коренеплоди – 8%, м'ясо-кісткове борошно – 2%, мінерально-вітамінний комплекс – 2%. Усі сухі інгредієнти подрібнювали і перемішували, додавали подрібнені лікарські рослини і виготовляли гранули. Загальна кількість корму на одну групу складала 4 кг. Коренеплоди давали кожного дня окремо, у визначеній кількості.

Лікарські рослини. Лікарську рослинну сировину у вигляді офіційної форми, або зібране, висушене і подрібнене додавали до раціону. Рослини зібрані у ботанічному саду Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна (48.4355°N , 35.0431°E). У досліді було досліджено: траву (молоді пагони і листя) меліси лікарської (*Melissa officinalis*), шавлії лікарської (*Salvia officinalis*) і лаванди вузьколиста (*Lavandula angustifolia*). У раціон додавали 5% подрібненої сухої лікарської сировини.

Схема і тривалість експерименту. Для досліду було сформовано чотири групи тварин: контрольна, що отримувала лише високожировий раціон і три дослідні, які отримували високожировий раціон з додавання 5% лікарських рослин. Дослід тривав 30 діб (Lieshchova and Brygadyrenko, 2021).

1.2. Бактеріологічні дослідження

Метою бактеріологічних досліджень було – визначення нормальної мікрофлори та виявлення патогенних збудників (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* патогенних тощо). Дослідження мікробіоти кишечника мають бути ретельно сплановані.

Бактеріологічне дослідження проводять в декілька етапів. Відбір біологічного матеріалу здійснюють від тварин після евтаназії. Для цього дрібним



Рис. 1. Утримання щурів у полікарбонатних клітках.

гризунам і мурчакам слід внутрішньочеревно вводити приблизно 2 мл/кг маси тіла стерильного 10% пентобарбітону, змішаного в етанолі разом із лідокаїном.

Усі роботи проводяться стерильними інструментами, які необхідно стерилізувати в автоклаві або сухому жарі перед кожним взяттям зразка (скальпель, ножиці й пінцети). Проводять розтин лабораторних тварин за загальноприйнятими правилами і відрізають ділянку прямої кишки та поміщають в чашку Петрі (Hansen and Nielsen, 2015).

Відбір зразків фекалій проводиться платиновою голкою (наприклад, 0,5 мм), яка стерилізується полум'ям між кожним відбором. Спочатку здійснюється очищення інструментів в склянці етанолу (70% або 93%), а потім – над полум'ям пальника (між кожним відбором зразка). Відібрані зразки фекалій одразу досліджують.

На попередньо підготовлені та зважені (пергамент або вощанку) стерильні папірці розміром 3×2 беруть 1 г нативних фекалій та зважують на торзійних вагах. Перекладають і розтирають у ступці з 9 см³ фізіологічного розчину (10⁻¹). За недостатньої кількості фекалій у кишечнику (менше 1 г) беруть максимально можливу кількість вмісту та перераховують об'єм фізіологічного розчину, який буде внесено в бюкс для отримання розведення 1:10. Наприклад, за умови відбору 0,64 г фекалій потрібно додати розчинника у кількості 0,64×9 = 5,76 см³, можна округлити до 5,8 см³. Після цього, фекалії ретельно емульгують за допомогою скляної палички, протягом 10–15 хв за кімнатної температури і дають осісти частинкам, що не розчинилися, і з основного розведення у фізіологічному розчині роблять ряд наступних (1:100; 1:1000; 1:10000 і т. д.). Для кожного розведення фекалій застосовують стерильну піпетку. Для успішного культивування того чи іншого мікроорганізму живильні середовища за своїми властивостями повинні бути наближені до природних умов його існування.

Приготування розведень. 0,1 см³ основного розведення із бюкса переносять в першу пробірку з 9,9 см³ стерильного фізіологічного розчину та струшують. Так отримують розведення 10⁻³. Із цієї пробірки беруть 0,1 см³ фекального біоптату та переносять в другу пробірку з 9,9 см³ фізіологічного розчину та отримують розведення 10⁻⁵. Так роблять до отримання розведень 10⁻¹¹.

Після цього, проводять висів усіх розведень на елективно-диференціальні середовища: Блаурокка (або біфідум-середовище), лактобак-агар, ентерококовий агар, агар Ендо, вісмут-сульфідний агар, середовище Вільсона-Блера, Байрд-Паркера, декстрозний агар Сабуро, 3–5% кров'яний агар, тощо.

Із кожної пробірки стерильною піпеткою беруть по 0,1 см³ фекального біоптату і вносять у чашки Петрі з відповідними живильними середовищами. При цьому розведення збільшується ще у 10 разів. По поверхні агару розчин суспензії розтирають стерильним шпателем до повного його поглинання. У пробірках з середовищем Блаурокка вносять по 0,5 см³ розчину з певним розведенням. При цьому ступінь розведення зростає на порядок (Камінська, 2015).

Із бюкса 0,1 см³ розчину вносять у середовища Ендо, вісмут-сульфідним агаром та залізо-сульфідний агар. Так отримують розведення 10⁻². Потім, із

першої пробірки 0,1 см³ розчину вносять у чашки Петрі із агаром: кров'яним, Ендо, Байрд-Паркера та Сабуро. Таким чином, отримують розведення 10⁻⁴. Із другої пробірки 0,1 см³ розчину вносять із середовищем Ендо та 0,5 см³ розчину в пробірку з середовищем Блаурокка. Отримують розведення 10⁻⁶. Також 0,1 см³ з третьої пробірки вносять із середовищем Ендо та 0,5 см³ розчину в пробірку з середовищем Блаурокка та отримують розведення 10⁻⁸. За наведеним вище принципом отримують розведення 10⁻⁹ та 10⁻¹⁰. Також, починаючи з розведення 10⁻⁵ фекального біоптату, здійснюють посіви на лактобакагар по 10⁻⁸–10⁻¹¹ та ентерокок агар по 10⁻⁸ розведення (табл. 1).

Таблиця 1 – Схема посіву на різні середовища

Назва живильного середовища	Розведення, що висівають	Кількість чашок, пробірок
Пробірка із буферним розчином для титрування	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 11	11
Пробірка для посіву Шукевича	1	1
Пробірка із середовищем збагачення (селеніт, магнієве)	1	1
Чашка з середовищем для ентеробактерій	1, 2, 6, 7, 8	5
Чашка з середовищем для стафілококів	2, 3, 4, 5	4
Чашка із середовищем для грибів	3, 5	2
Чашка з середовищем для ентерококів	5, 6, 7	3
Чашка з середовищем для гемолітичних ешерихій	6	1
Пробірка з середовищем для клостридій	2, 3, 4	3
Чашка з середовищем для лактобактерій	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	7
Пробірка з середовищем для біфідобактерій	7, 8, 9, 10	4
Чашка з середовищем для кампілобактерій	3, 5	2
Чашки із середовищем для бактероїдів	7, 8 4	

Примітка: розведення матеріалу та набір живильних середовищ може варіювати, зберігаючи загальний принцип дослідження.

Після посівів, чашки та пробірки залишають на столі на 15 хвилин, потім переносять у термостат за температури 24 та 37°C на 24–96 годин інкубування.

Лактобактерії та анаероби (біфідобактерії, клостридії) культивують за 37°C протягом 48–96 годин в анаеростатах чи ексикаторах із газпакемом, що забезпечує концентрацію вуглекислого газу 5–10% для лактобактерій і відсутність кисню для анаеробів. Контроль анаеробіозу проводять за допомогою оксидного анаеробного індикатору.

Облік результатів на середовищах Ендо, кров'яному агарі та вісмут-сульфітному агарі здійснюють через 24 години після засіву, чашки із середовищами Байрд-Паркера та Сабуро – через 48 годин, а середовище Блаурокка мікроскопують на 4-у добу росту (Камінська, 2015).

1.3. Інтерпретація результатів дослідження

На підставі даних бактеріологічних досліджень (дво- та триразових) визначається ступінь зміни мікрофлори кишечника за наявності стійких відхилень від норми за якісними та кількісними показниками.

Кількість живих мікроорганізмів у чашках Петрі визначають шляхом підрахунку колоній, що вирости, та рахують середньоарифметичне значення кожного розведення. Результати виражають у КУО/г (колонієутворюючих одиницях на 1 грам маси фекального біоптату). Ідентифікацію мікроорганізмів проводять з урахуванням вивчення морфології (після фарбування за Грамом мазків), культуральних і біохімічних властивостей виділених культур згідно з визначником бактерій Бергі. Контроль стерильності поживних середовищ проводять у термостаті, куди поміщають чашки Петрі та пробірки з відповідними середовищами без посівного матеріалу.

Через 20–22 години на середовищі Ендо у розведенні 10^{-2} підраховують число і визначають відсоток лактозонегативних (білих чи безбарвних) колоній по відношенню до всього числа колоній, що вирости. Їх чисельність у загальній кількості кишкової палички зазвичай незначна (менше 0,1 %). Наприклад: на середовищі Ендо вирости 10 лактозонегативних колоній при посіві 0,1 мл фекалій з розведення 1:100000. При розрахунку слід 10 помножити на 10, а потім на 100 000 (ступінь розведення). Отже, в 1 г фекалій буде 10000000 лактозонегативних ентеробактерій.

Оскільки, на середовищі Ендо ростуть ентеробактерії, тому звертають увагу і підраховують загальну кількість колоній, які забарвлені в темно-червоний колір з металевим блиском і червоних (штами кишкової палички із нормальною ферментативною здатністю lac⁺), рожевого кольору (слабке розкладання лактози lac[±]) та білих колоній (лактозонегативні штами lac⁻) із врахуванням ступеня розведення (рис. 2).

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 (Камінська, 2015).

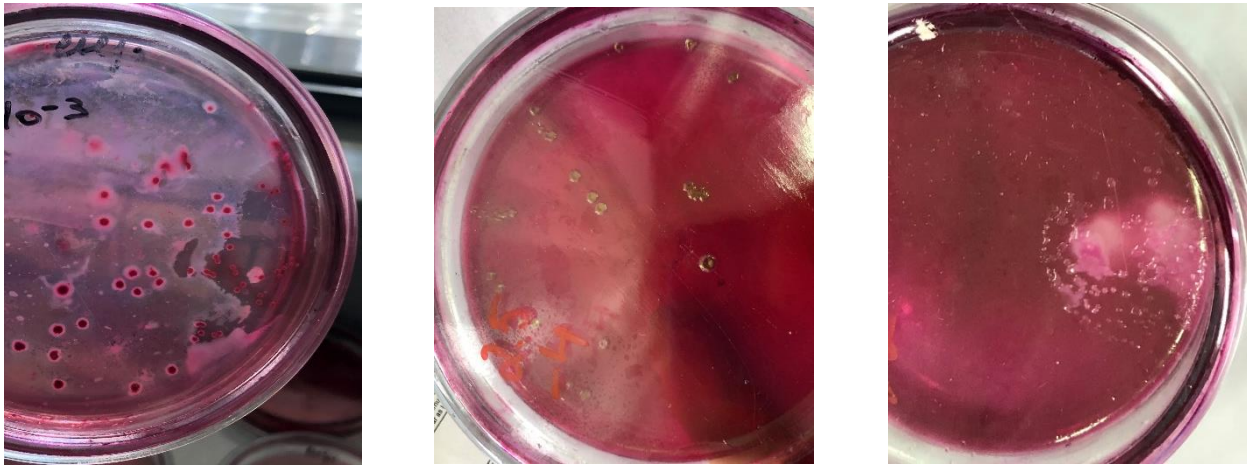


Рис. 2. Колонії лактозопозитивних та лактозонегативних ентеробактерій на середовищі Ендо

На чашках із вісмут-сульфітним агаром ідентифікують лактозонегативні ентеробактерії, які належать до родів *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* (Білан, Лещова, 2022; Зажарський та ін., 2023). Для цього підраховують кількість однакових колоній та відсівають їх на середовища Олькеницького та Сімонса для ідентифікації. Також посів здійснюють в пробірку з бульйоном, під пробкою якої затискають індикатор на визначення індолу. Культивування здійснюють за умов термостату протягом 24 години за температури 37°C (рис. 3).



Рис. 3. Диференційна діагностика ентеробактерій на середовищах Олькеницького, малонат агарі, Сімонса та Крістенсена

Після цього також фіксують наявність певних біохімічних властивостей мікроорганізмів (Камінська, 2015). Видову ідентифікацію родів *Enterobacter* та *Klebsiella* проводять за допомогою тестів: утворення лізиндекарбоксілази – для ентеробактера та виділення індолу – для клебсієл. У клінічній практиці рід *Enterobacter* найчастіше представлений двома видами (*E. aerogenes* і *E. cloacae*), які відрізняються здатністю декарбоксілювати L-лізин (Бекташева та ін., 2011; Ушкалов та ін., 2015; табл. 2). Також родовий склад лактозонегативних ентеробактерій, що не належать до патогенних мікробів родини Enterobacteriaceae, може бути визначений за допомогою різноманітних тестів. Наприклад, ОКСІ-тесту – індивідуального тесту для виявлення бактеріальної цитохромоксидази (рис. 4).

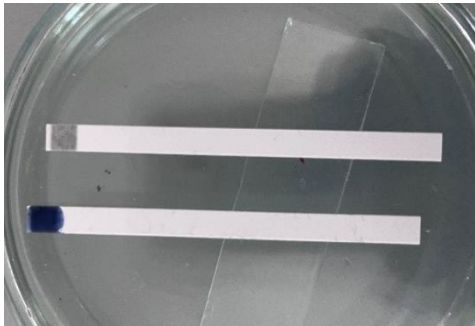


Рис. 4. Позитивний тест на оксидазу (посиніння папірця)

На кров'яному агарі враховують відсоткові співвідношення колоній кишкової палички, що володіють (із зонами лізису – α чи β) і не мають гемолізуючих властивостей; співвідношення колоній кишкової палички та кокових форм; співвідношення гемолізуючих та негемолізуючих коків. Кількість в 1 г фекалій зазначених груп мікробів враховують, як це було зазначено, на середовищі Ендо. Ідентифікацію гемолізуючих штамів мікроорганізмів проводять приготуванням фіксованих мазків

на предметних скельцях та шляхом фарбування за Грамом мікроскопують. Виявляють гемолізуючі стрептококи, стафілококи, ентеробактерії.

Культури стафілококів перевіряють у реакції плазмокоагуляції. При визначенні коагулазної активності користуються ліофілізованою плазмою крові кролика, яку розводять стерильним фізіологічним розчином 1:5 та розливають у стерильні пробірки по 0,5 см³ на кожну. У пробірку засівають 1 петлю добової агарової культури досліджуваного штаму і поміщають термостат за 37°C. Облік результатів проводять через 30 хв, 1 годину, 2 години та 24 години. Позитивними вважаються всі ступені згортання плазми від невеликого згустку, що залишається нерухомим при перевертанні пробірки.

На середовищі Байрд-Паркера здійснюють підрахунок чорних колоній, які утворюють штами стафілококів (рис. 5). Окремо фіксують колонії із райдужним вінчиком навколо колоній, що свідчить про наявність у них ферменту лецитинази (патогенні штами).

Ідентифікацію нетипових колоній проводять посівом на середовище Олькеницького та Сімонса, культивуванням за температури 37°C протягом 24 години та вивченням певних біохімічних властивостей мікроорганізмів. При вивченні ферментації маніту посів добової агарової культури штаму, що досліджують засівають уколом у стовпчик 1% агару з манітом та вазеліновим маслом. При ферментації маніту стовпчик агару синіє. Позитивною вважається реакція при ферментації 2/3 стовпчика агару. Кількість стафілококів

визначається у межах 10^2 – 10^5 КУО/г, а чисельність патогенних штамів повинно не перевищувати 10 % від загальної кількості кокових форм.

Таблиця 2 – Основні диференційні ознаки ентеробактерій

Тести/ субстрати	Родина Enterobacteriaceae, рід							
	<i>Citrobacter</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Escherichia</i>
В-Галактозидаза	+	+, -	-	+	+	+	+	+
Індол	p	-	p	p	-	-	-	+
Сірководень	+, -	+, -	+, -	-	-	-	-	+, -
Гідроліз сечовини	p	-	p	+, -	-	p	p	-
Ріст в присутності KCN	+	+, -	+	+	+	-	+	-
Лізіндекарбоксилаза	-	+	-	p	+	±	+	+, -
Цитрат	+	+	p	p	+	+	+	-
Малонат	p	p	-	+	p	-	+, -	+, -
Мукат	+	p	-	p	-	-	p	+, -
D-Гартрат	+	p	+	p	-	+, -	-	+, -
Реакція Фогеса-Проскауера	-	-	-	p	p	p	+	-
Гідроліз желатину	-	p	p	p	-	+	+, -	+
Фенілаланін	-	-	+	-	-	-	-	-
Сахароза	p	-	p	p	-	+	p	p
Лактоза	p	+, -	-	p	-	p	+	p
Глюкоза	+	+	+	+	±		+	+
Маніт	+	+	-	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	±	+	+	+	+	+, -
Ріст на агарі Сімонса	+	+	+	+	+	-	+	-
Рухливість	+, -	-, +	+, -	-		±	+	+, -

Примітка: «-» – негативна реакція в період усього терміну спостереження у 90% штамів або більше; «+» – позитивна реакція через 18–24 год у 90% штамів або більше; «p» – різні результати реакції; «+, -» – частіше позитивна, рідше негативна реакція у 90% штамів і більше; «+, (-)» – частіше позитивна, рідше

сповільнена негативна реакція у 90% штамів і більше; «-, +» – частіше негативна, рідше позитивна.

Для диференціації ентерококів від інших диплококів і диплострептококів застосовують тести: визначають здатність рости і редукувати метиленову синьку в молоці, в бульйоні з 40% жовчі, розщеплення маніту, терморезистентність (виживання за 60°C).

На середовищі Сабуро звертають увагу на щільні непрозорі молочно-білі колонії (рис. 6).

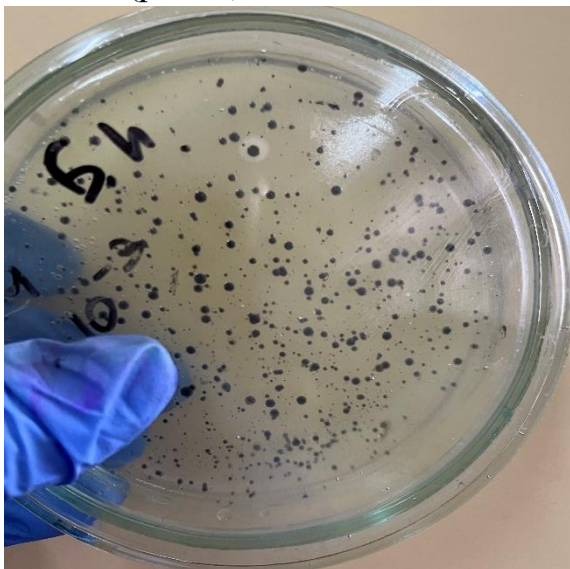


Рис. 5. Формування колоній патогенних та непатогенних колоній на середовищі Байрд-Паркера

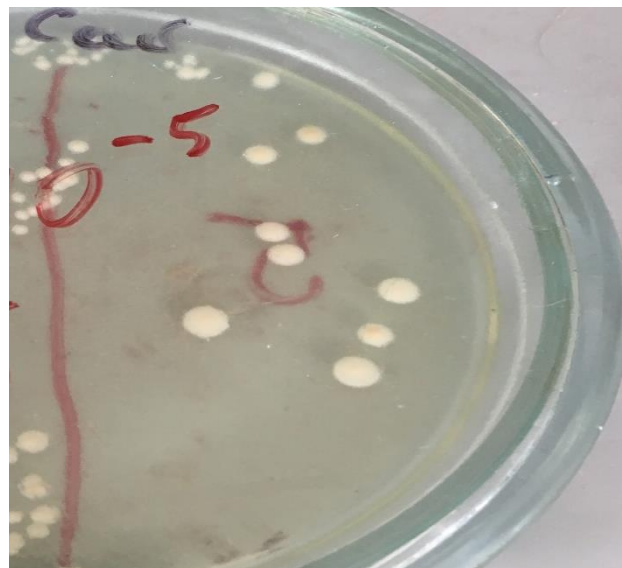


Рис. 6. Колонії дріжджеподібного гриба роду *Candida*

Враховують наявність *C. perfringens* (сульфітредукуючі клостридії) на залізо-сульфітний агарі за здатністю відновлювати сульфат до сульфідів. Останній здатний реагувати з залізом і утворює чорний осад сульфідів заліза, помітний у вигляді чорних колоній.

При визначенні біфідобактерій на Блаурокка середовищі враховують формування окремих колоній у вигляді «комет, цвяхів, тяжів та кульок», які розташовані по всьому об'єму середовища (рис. 7). Після цього, готують пофарбовані за Грамом мазки. Біфідобактерії мають вигляд грампозитивних паличок з розгалуженнями на кінцях, розташованих у вигляді римської цифри V, з дещо потовщеними кінцями або у вигляді скупчень, що нагадують китайські ієрогліфи.

Зведені результати заносять в таблицю. Загальну кількість клітин *E. coli* подають як сумарну кількість штамів із нормальною ферментативною активністю (темно-фіолетові з металевим блиском колонії та червоні колонії), слабоферментуючих штамів (рожеві колонії) та лактозонегативних штамів (білі безбарвні колонії на середовищі Ендо). Кількість слабоферментуючих та лактозонегативних штамів кишкової палички розраховується у відсотках від загальної кількості кишкової палички (Путніков та ін., 2015).

На кров'яному агарі загальну кількість гемолізуючих штамів визначають кількістю колоній із зонами гемолізу (α чи β). При цьому за результатами мікроскопії та біохімічних показників вказується, штами яких саме мікроорганізмів спричинили гемоліз (стрептококи, стафілококи, ентеробактерії). За кількістю чорних колоній на середовищі Байрд-Паркера визначається загальна кількість стафілококів. Вказується кількість патогенних штамів у відсотковому показнику.

Кількість лактобактерій та біфідобактерій визначається їх максимальним розведенням, за якого фіксується присутність клітин мікроорганізмів цих груп у приготованих для мікроскопії препаратах. Наприклад, 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 спостерігається, то кінцевим буде показник 10^6 КУО/г.

Лактозонегативні ентеробактерії вказуються окремо з вказанням роду мікроорганізму (*Proteus*, *Citrobacter*, *Salmonella* чи інші), що встановлюється за результатами визначення біохімічних властивостей штамів на середовищах Олькеницького, Сімонса, строкатому ряді на середовищі Гісса, шляхом застосування діагностичних систем API 20 STREP, API 20 E, API 10 S, API Staph, API 20 NE.

Кількісний та якісний склад мікрофлори кишечника сільськогосподарських та лабораторних тварин наведено в таблиці 3 (Гадзевич та ін., 2012; Камінська, 2015; Путніков та ін., 2015; Bilan et al., 2019, 2022).

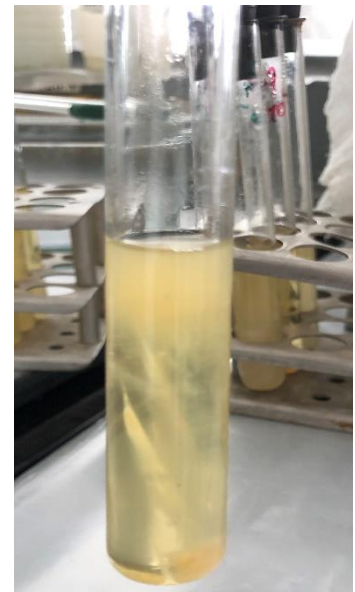


Рис. 7. Ріст *Bifidobacterium* spp. на середовищі Блаурокка у вигляді «комет»

2. ОСНОВНІ ПРЕДСТАВНИКИ НОРМАЛЬНОЇ МІКРОФЛОРИ КИШЕЧНИКА ТВАРИН

Кишкова мікрофлора є типовим біоценозом, де всі представники взаємопов'язані і впливають один на одного та впливають на макроорганізм, який у свою чергу впливає на кишкову мікрофлору (табл. 3). Як уже зазначалося раніше, стан біоценозу кишечника може визначатися впливом чинників: вік, харчування, фактори навколишнього середовища, тощо.

Основними представниками облигатної мікрофлори кишечника є *біфідобактерії*. У групу біфідобактерій об'єднуються грампозитивні, безспоріві, плеоморфні, анаеробні бактерії. Морфологічна особливість – роздвоєння (біфуркація) кінців клітини. У мазку можна побачити декілька різних форм: «оленячі роги» – палички з численними відгалуженнями; характерні досить великі бактерії з роздвоєнням одному чи обох полюсах; рідше зустрічаються V-подібні форми, а також рівні, злегка вигнуті палички з кулястими здуттями на полюсах або з витонченими кінцями. Культивуються за температури 37–39°C. Каталазонегативні, не утворюють газу, розкладають численні вуглеводи, спирти, молоко згортають протягом 24 год. На кров'яному агарі формують опуклі, гладкі, і сплюснені, нерівні колонії, розміром від голівки шпильки до 5 мм. Колір – від безпігментного до світло- і темно-коричневого, консистенція колоній – від пастозних до сухих. На середовищі Блаурока зустрічаються колонії сочевицеподібні, ромбоподібні, трикутні та безформні шорсткі («шматочок вати»), частіше білого кольору. Біфідобактерії – є природніми імуномодуляторами. Вони стимулюють проліферацію лімфоїдної тканини шлунково-кишкового тракту, підсилюють фагоцитарну активність макрофагів, моноцитів, гранулоцитів, специфічний гуморальний імунітет, синтез цитокінів (γ -ІФ, ІЛ-6, ФНП та ін.) (Андріанова та ін., 2015).

Біфідобактерії входять до складу багатьох мікробних співтовариств. Вони здатні до адгезії і забезпечують їх прикріплення до поверхні слизового шару кишки та участь у харчуванні біля стінок, ферментації субстратів. Біфідобактерії приймають участь у формуванні біоплівки на поверхні слизистого шару кишки, перешкоджають розмноженню патогенних і умовно-патогенних бактерій. Мікроорганізми роду *Bifidobacterium* виробляють вітаміни групи В, та вітамін С, також продукують ряд амінокислот (аргінін, аланін, лізин, валін, метіонін, лейцин, тирозин), нікотинову, фолієву, 5-аміновалеріанову та гамма аміномасляну кислоти та біотин та антибіотичні субстанції, що пригнічують ріст умовно-патогенних мікроорганізмів. Недостатня кількість біфідобактерій сприятиме зниженню синтезу вітаміну К та порушенню згортання крові.

Бактероїди також виявляють в товстій кишці. Це гетерогенна група мікроорганізмів, які відносять до родів *Anaerorhabdus*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Bilophila* та багато інших. Деякі види потенційно здатні викликати патологічні процеси, але переважна їх кількість припадає на інфекції, спричинені видами *Bacteroides fragilis* (*B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. vulgaris*, *B. distasonis*). Бактероїди грамнегативні, рухливі або нерухливі палички, які не утворюють

спор, суворі анаероби. Палички можуть бути дрібними і з помітним поліморфізмом. На кров'яному агарі колонії круглі, гладкі, дрібні. Бактероїди ростуть з характерним важким специфічним запахом. Відомо понад 20 видів бактероїдів. Оскільки бактероїди абсолютні анаероби, короткочасний контакт з киснем повітря припиняє їхній ріст.

Лактобактерії частіше являють собою грампозитивні палички із заокругленими кінцями, довжиною до 4–5 мкм, які розташовуються поодинокі, попарно або короткими ланцюжками, нерухливі (рис. 8). Серед лактобацил зустрічаються короткі кокоподібні та звивисті форми, а також довгі, ниткоподібні палички завдовжки від 0.7–1.1 до 3.0–8.0 мкм поодинокі або зібрані в ланцюжки. Спор не утворюють. За типом дихання – факультативні анаероби чи мікроаерофіли. Культивуються за температури 37°C. На агарі утворюють дрібні ніжні колонії з гладкими або нерівними краями (павучкоподібні). На середовищі МРС-4 – гладкі, білі, випуклі, середні за величиною колонії, хоча можуть формувати великі, шорсткі, молочно-білого кольору. У здоровому кишечнику молочнокислі палички зустрічаються у трьох формах з переважанням перехідних від «М» (мукоїдної) до «R» (шорсткої). Ідентифікацію видів лактобактерій проводять за біохімічними та фізіологічними тестами: здатність до розщеплення глюкози з утворенням газу, ферментація значної кількості вуглеводів та ін. (Андріанова та ін., 2015).

Лактобактерії беруть участь у ферментативних процесах. Кінцевими продуктами метаболізму половини лактобацил є лактат. Також, вони здатні синтезувати незамінні амінокислоти та вітаміни, продукують перекис водню, лізоцим та ряд антибіотикоподібних речовин, що забезпечує антагоністичний вплив на патогенну та умовно патогенну мікрофлору. Деякі лактобактерії здатні продукувати діацетил, який у комплексі з іншими метаболітами перешкоджає росту збудників хронічних інфекцій (мікобактерії туберкульозу) і сприяє зниженню швидкості росту представників родини ентеробактерій. Для культивування бактерій роду *Lactobacillus* використовуються середовища, багаті на поживні речовини (дріжджовий екстракт, гідролізат знежиреного молока, пептон, твін-80), з різними солями, у тому числі ацетатом натрію та інші, які мають низький рівень рН (4,5–6,2) (рис. 9).

Ешерихії – основні симбіонти аеробної мікрофлори, відносяться до родини Enterobacteriaceae. Ешерихії – грамнегативні, не утворюють спор, рухливі палички (рис. 10). Утворюють індол, дають негативну реакцію Фогеса–Проскауера та позитивну з метилрот; не розщеплюють сечовину та зазвичай не утилізують цитрат амонію, не здатні розріджувати желатину. Проте, здатні розщеплювати лактозу. Хоча зустрічаються штами, що не ферментують її. Кишкова паличка здатна втрачати ферментативну активність та рухливість.

Escherichia coli відіграють найважливішу роль у функціонуванні шлунково-кишкового тракту. Вони є основними конкурентами щодо патогенної мікрофлори щодо заселення ними кишечника. Кишкові палички забирають з просвіту кишечника кисень, який шкідливий для розмноження біфідо- та лактобактерій. *E. coli* виробляють вітаміни: В1, В2, В3, В5, В6, В9, В12, К, жирні

кислоти (оцтову, мурашину, інші штами також молочну, бурштинову та інші), беруть участь в обміні холестерину, білірубіну, холіну, жовчних кислот, впливають на всмоктування заліза та кальцію (Мінухін та ін., 2014; Андріанова та ін., 2015).

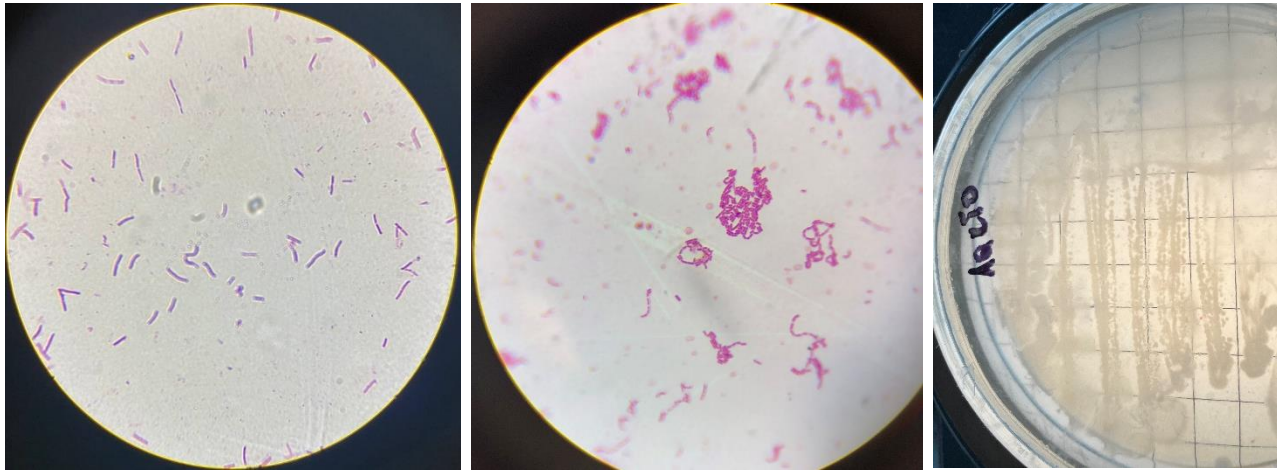


Рис. 8. *Lactobacillus* spp. – фарбування за Грамом, ×1600

Рис. 9. Колонії *Lactobacillus* spp. на лактобак-агарі

Ентерокок – диплококи, які мають подовжену форму, розташовується по одиночці, групами та довгими ланцюжками (рис. 11).

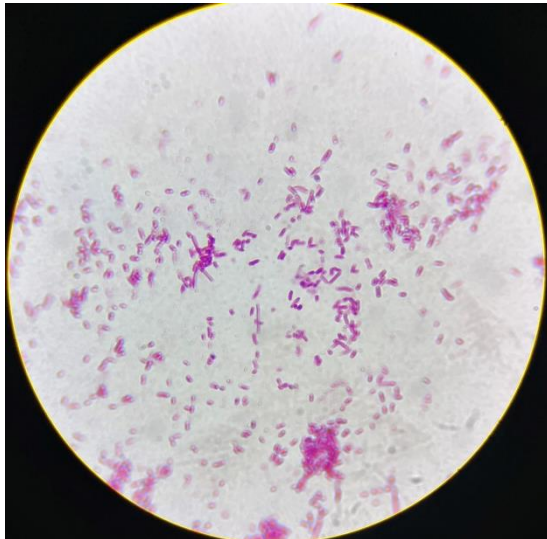


Рис. 10. Грамнегативні ентеробактерії – мазок з агару Ендо, ×1600

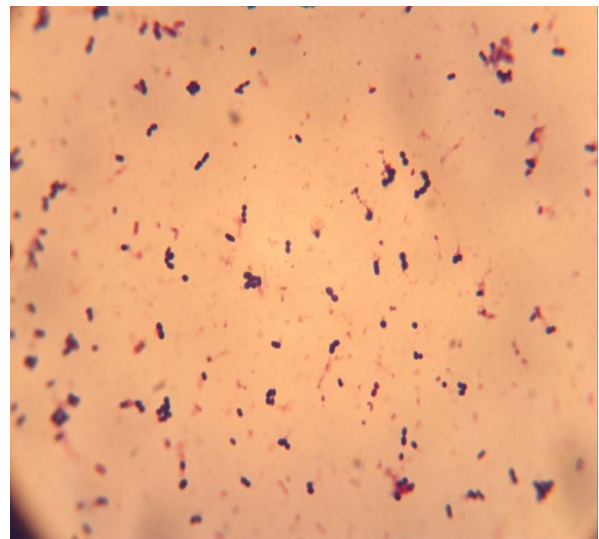


Рис. 11. Витягнуті диплококи *Enterococcus* spp. – фарбування за Грамом, ×1600

За Грамом забарвлюється позитивно, нерухливі, не розріджую желатину, не утворюють згусток казеїні в молоці. У бульйоні росте дифузно. На цукровому і кров'яному агарі формують дрібні, опуклі, гладкі, напівпрозорі ніжні, сірувато-білі або сріблясті колонії. Домінуючими видами у кишкової флорі є *E. faecalis* та

E. faecium. Внутрішньовидову диференціацію ентерококів проводять за ферментативними, гемолітичними властивостями. Гемолізуючі ентерококи також здатні викликати харчові отруєння та дисбактеріози кишечника. Складність виділення та кількісного обліку ентерококів полягає у тому, що на застосовуваних середовищах, найчастіше м'ясопептонному агарі з 1% глюкози або з 5% крові, рясно виростають та інші види, колонії яких морфологічно важко диференціювати.

Описані бактеріальні види зустрічаються у складі асоціації кишкової флори. Можуть зустрічатися бактерії родів *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* та ін. Усі вони є представниками родини Enterobacteriaceae є грамнегативними, аеробними, можуть бути як рухливими, так і нерухливими. Ці бактерії здатні рости на звичайних живильних середовищах, розщеплювати глюкозу з утворенням або без утворення газу та редукують нітрити з нітратів. У здоровому кишечнику перераховані вище представники родини Enterobacteriaceae зустрічаються непостійно та у невеликих кількостях. Умовно-патогенні мікроорганізми стають збудниками запальних процесів лише за умови зниження резистентності макроорганізмів.

Бактерії всіх видів роду *Proteus* дрібні, поліморфні грамнегативні палички. Середній розмір 0,4–0,6×1,0–3,0 мкм. Рухливі, перитрихи. Спор і капсул не утворюють. Факультативні анаероби, добре ростуть на простих живильних середовищах за 20–37°C. H-форми дають повзучий ріст на щільному живильному середовищі, а при посіві в конденсаційну рідину чистої культури за Шукевичем – "роїння", з утворенням дочірніх відростків. На середовищах з додаванням жовчі утворюють O-форми – великі колонії з рівними краями. На бульйоні дають помутніння, густий білий осад і ніжну плівку на поверхні. На щільному середовищі – колонії середньої величини, напівпрозорі. Володіють вираженими цукролітичними властивостями – розщеплюють глюкозу, мальтозу, сахарозу та інші вуглеводи з утворенням кислоти і газу, не ферментують лактозу, маніт; протеолітичними – розріджують желатин, згорнуту сироватку, згортають молоко, розщеплюють сечовину, утворюють сірководень, індол, аміак. Оксидазо-негативні й каталазо-позитивні (Мінухін та ін., 2014).

Citrobacter spp. – грамнегативні палички, рухливі завдяки перитрихіально розташованим джгутикам. Спор і капсул не утворюють. Факультативні анаероби, добре ростуть на простих живильних середовищах, утворюючи випуклі колонії діаметром 2–4 мм, які трохи опалесціують. На рідких середовищах дають гомогенне помутніння. Температурні межі росту – 12–43°C, оптимум рН – 7,2. На вісмут-сульфіт агарі утворюють зеленувато-коричневі або чорні колонії та виділяють летучі сполуки з неприємним запахом. Розщеплюють глюкозу, лактозу, сорбіт, рамнозу, утилізують цитрат, позитивна реакція Фогеса-Проскауера. Оксидазонегативні й каталазо-позитивні. Цитробактери отримали свою назву у зв'язку зі здатністю утилізувати цитрат натрію – як єдине джерело вуглецю. Виділення цитробактерів із випорожнень утруднене тим, що здатність бактерій ферментувати лактозу може маскувати їх на середовищах МакКонкі й Плоскирева. Більш придатне для використання середовище з 0,5 % вмістом

тирозину, оскільки лише цитробактери можуть викликати його прояснення. На агарі Ендо штами, які розщеплюють лактозу, утворюють рожеві колонії, але без металевого блиску. На середовищі Плоскірева лактопозитивні колонії мають насичений червоний колір з темним центром, на вісмут-сульфітному агарі – коричневі або чорні колонії. За підозри на ріст цитробактерів рекомендують робити посіви на агар із цефсулодином і новобіоцином, на якому бактерії утворюють колонії з червоним центром і прозорою безкольоровою периферією («бичаче око»). У середовищі Гісса цитробактери ферментують глюкозу, лактозу, маніт, мальтозу, рамнозу, сорбіт, арабінозу і ксилозу. Вони здатні утилізувати цитрат. Виділяють каталазу, не продукують оксидазу, дають негативну реакцію Фогес-Проскауера, ростуть на агарі Сімонса. У мазках мають вигляд маленьких прямих грамнегативних паличок, розташованих поодинокі або парами. Серологічна ідентифікація проводиться в РА з полівалентною О-антисироваткою. Заключну ідентифікацію проводять з Н-монорецепторними сироватками (Мінухін та ін., 2014; Андріанова та ін., 2015).

Клебсієли – грамнегативні короткі товсті палички $0.6-6.0 \times 0.3-1.5$ мкм із закругленими кінцями. Нерухливі, спори не утворюють. Утворюють капсулу. У мазках розташовані поодинокі, попарно або короткими ланцюжками. Факультативні анаероби. Добре ростуть на простих живильних середовищах за $35-37$ °С, рН 7,2. На щільних середовищах утворюють великі куполоподібні слизисті каламутні колонії, в бульйоні – інтенсивне помутніння. Легко культивуються на середовищах Ендо, Плоскірева. На середовищі Ендо колонії яскраво пофарбовані з металевим блиском. Ферментують лактозу, розщеплюють глюкозу і маніт з утворенням кислоти і газу, розкладають сечовину, не утворюють індол і сірководень. Оксидазо-негативні й каталазо-позитивні.

Представники роду *Enterobacter* – грамнегативні палички, рухливі, в мазках розташовані поодинокі, рідше короткими ланцюжками, дають негативну реакцію з метиловим червоним. Деякі штами утворюють капсулу. Бактерії роду *Enterobacter* добре ростуть на звичайних живильних середовищах (за $30-37$ °С, оптимум рН – 7,2), які використовують для вирощування ентеробактерій. Факультативні анаероби. На твердих середовищах утворюють слизові й неслизові колонії, які нагадують колонії ешерихій та клебсієл. Лактозопозитивні штами утворюють рожеві або малинові колонії на середовищі Ендо, Плоскірева і Мак-Конкі. Лактозонегативні штами – жовтуваті колонії. Викликають помутніння рідких середовищ. Ентеробактери не утворюють індол і сірководень, не володіють дезаміназами амінокислот, утилізують цитрат, слабо гідролізують сечовину, ферментують сорбіт, рамнозу, ксилозу, мальтозу, рафінозу, сахаразу, варіабельні відносно інозиту, адоніту, дульциту, саліцину (Мінухін та ін., 2014; Андріанова та ін., 2015).

Рід *Serratia* є одним із найстаріших представників родини ентеробактерій. Найчастіше виділяють основні три види: *Serratia marcescens*, *S. rubidaea*, *S. liquefaciens*. Це прямі грамнегативні палички, $0.9-2.0 \times 0.5-0.8$ мкм, окремі штами мають капсулу. На кров'яному агарі *S. marcescens* і *S. rubidaea* утворюють прозорі сірувато-білі колонії, гладкі або дрібнозернисті. Через 24–48 год за

кімнатної температури вони виробляють червоний пігмент. На диференційних середовищах колонії безбарвні, гладенькі, трохи випуклі. На агарі з ДНК-азою і толуїдиновим синім серації утворюють колонії з характерною синьою облямівкою, у той час як колонії інших ентеробактерій її не мають. Серації постійно ферментують гліцерин, мальтозу, маніт, саліцин, сахарозу і сорбіт. Такі спирти і вуглеводи як адоніт, інозит, ксилозу і целобіозу вони розщеплюють варіабельно, ростуть на цитратних середовищах і дають позитивну реакцію Фогес-Проскауера. Факультативні анаероби, ростуть за температури від 10 до 36°C. Володіють вираженою каталазою. Продукують два різні пігменти: продигіозин і піримін. Продигіозин не дифундує в середовище, нерозчинний у воді, продукується *S. marcescens* і більшістю штамів *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, пігментуючи колонії в червоний колір різної інтенсивності. Колір залежить від умов культивування. Для виявлення пігменту бактерій краще культивувати на гліцерин-пептонному агарі за 20–35°C. Піримін розчинний у воді, дифундує в середовище. *S. marcescens* на кров'яному агарі за 37°C утворює сірувато-білі прозорі S-колонії діаметром 1–2 мм, які можуть бути гладкими або дрібнозернистими. За кімнатної температури через 24–48 год колонії стають червоними. На скошеному агарі бактерії утворюють гладкий білий наліт. Оскільки більшість ізолятів не ферментує лактозу, то на середовищі Плоскірева вони утворюють безбарвні колонії. Всі види розщеплюють глюкозу, маніт. Синтезують індол, відновлюють нітрати (Мінухін та ін., 2014; Андріанова та ін., 2015).

Також можуть зустрічатися бактерії роду *Pseudomonas*, а також стафілококи, клостридії, дріжджоподібні гриби та деякі інші мікроорганізми. Бактерії роду *Pseudomonas* – типові умовно-патогенні мікроорганізми, які широко поширені в зовнішньому середовищі, постійно мешкають в організмі людини (5 % серед здорових людей) і тварин, виділяються з ґрунту, води. За морфологією – це дрібні грамнегативні палички із заокругленими кінцями, розміром 1,5–3,0×0,5–0,8 мкм. Рухливі, моно- або лофотрихи. У мазках чистих культур палички розташовані поодинокі, попарно або у вигляді коротких ланцюжків. Спор не утворюють. Іноді утворюють капсулоподібний позаклітинний слиз. За типом дихання відносяться до аеробів, але можуть рости і за анаеробних умов. Добре ростуть на простих живильних середовищах за 37°C, але можуть рости і за 5–42°C. На МПА утворюють колонії розміром 2–5 мм, круглі, S-форми, напівпрозорі, голубувато-сірі з перламутровим відтінком, спаяні з середовищем, але можуть формувати плоскі, неправильної форми колонії з хвилястими краями або складчасті колонії з нерівною поверхнею (нагадують квітки маргаритки). На щільних середовищах у багатьох штамів синьогнійної палички спостерігають феномен веселкового лізису (обумовлений спонтанною дією бактеріофага) – поява на поверхні колоній плівки, веселки, що переливається всіма кольорами, у відображеному кольорі. Цей феномен можна розглядати як додаткову таксономічну ознаку. На МПБ дають помутніння, осад і утворюють характерну сірувато-сріблясту плівку, по мірі старіння культури виникає помутніння середовища в напрямку зверху вниз (Мінухін та ін., 2014).

Утворення слизу – характерна особливість вірулентних штамів, слиз додає в'язкість бульйонним культурам і колоніям. Характерною ознакою *P. aeruginosa* є пігменто- і ароматоутворення. Більшість штамів утворюють синьо-зелений пігмент – піоціанін, що забарвлює живильне середовище, відокремлення ран і перев'язувальний матеріал (рис. 12). Піоціанін розчинний у воді.



Рис. 12. *Pseudomonas spp.* – на м'ясо-пептонному агарі (колонії, які нагадують квітки маргаритки та виділення пігменту піоціаніну)

Він володіє антагоністичними властивостями відносно багатьох бактерій, але токсичний, і тому не використовується з лікувальною метою. Утворення пігменту – важлива діагностична ознака, його спостерігають у 70–80 % клінічних ізолятів. Переважна більшість культур також утворюють зелений пігмент флюоресцеїн (піовердин), флюоресцюючий за УФ-опроміненні. Деякі штами можуть синтезувати й інші пігменти: піорубін (червоний), піомеланін (чорно-коричневий) і L-оксифеназин (жовтий). Здатність до синтезу і чутливість до піоцинів широко варіюють у різних штамів, на чому засновано піоцинотипування псевдомонад. Майже всі штами *P. aeruginosa* мають характерний запах жасмину внаслідок утворення триметиламіну. Псевдомонади каталазо-позитивні, ферментують тільки один вуглевод – глюкозу до кислоти (рис. 13). Середовища строкатого ряду готують з малим вмістом пептону (до 0,1 %) і високої концентрації вуглеводів (до 2 %). Тест Хью-Лейфсона позитивний тільки з глюкозою (за аеробних умов). Протеолітична активність добре виражена: розріджують желатин і згортають сироватку крові, згортають молоко, руйнують гемоглобін (β -гемоліз). Дають позитивну реакцію на цитохромоксидазу, що є одним із провідних тестів при ідентифікації бактерій (Мінухін та ін., 2014; Андріанова та ін., 2015).

До факультативної мікрофлори кишечника відносяться клостридії – грампозитивні палички розміром від 0,9 до 9 мкм, розташовані поодинокі,

попарно, у вигляді ланцюжків або скупчень паралельних клітин, найчастіше рухливі. Ці мікроорганізми каталазонегативні та облігатні анаероби (рис. 14).



Рис. 13. Ферментативні властивості *P. aeruginosa*

Стафілококи – шаровидні, нерухливі (рис. 15), факультативні анаероби, каталазопозитивні, оксидазонегативні організми, які не утворюють спор та капсул. Здатні відновлювати нітрити, утворюють H_2S , розкладають глюкозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, гліцерин, маніт із виділенням кислоти. За наявністю коагулази всі стафілококи розділені на дві групи: коагулазопозитивні (*S. aureus*) та коагулазонегативні (Мінухін та ін., 2014; Андріанова та ін., 2015).

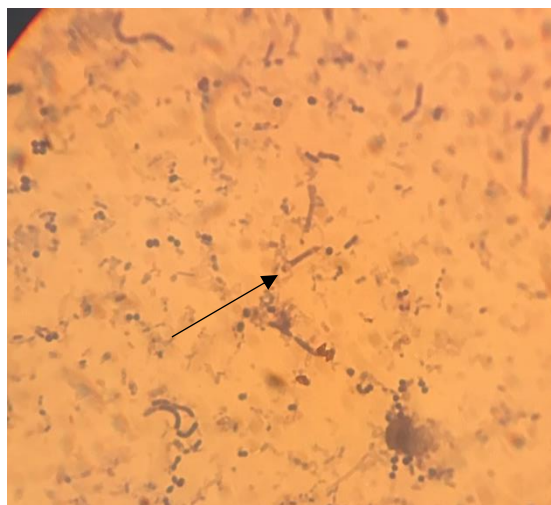


Рис. 14. Клостридії у мазку з фекалій лабораторних щурів. Фарбування за Грамом, $\times 1.600$

Найбільш клінічно значущим є *S. aureus* (золотистий стафілокок), який часто входить у склад нормальної мікрофлори макроорганізмів.



Рис. 14. *Staphylococcus spp.* – фарбування за Грамом, $\times 1600$

Кампілобактерії широко поширені в навколишньому середовищі, серед тварин та птиці. Найбільш поширеним патогеном, відповідальним приблизно за 90% випадків захворювання є *C. jejuni*. Інші види такі як *C. coli*, *C. lari* та *C. fetus* зустрічаються рідше. Представники роду *Campylobacter* – грамнегативні бактерії, що мають форму коми, серпа, чайки, що летить, короткої чи довгої спіралі або S-подібні; спор та капсул не утворюють, рухливі. Культивуються за $+37-42^{\circ}\text{C}$ за капнофільних умов. За культивування понад 48–72 години – утворюють кокоподібні форми (Kogut and Zhang, 2022).

Таблиця 3 – Порівняльна характеристика мікрофлори кишечника сільськогосподарських та лабораторних тварин *

Мікроорганізми	Клінічно здорові тварини (телята)	Щури	Миші
I. Анаеробні бактерії			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	$3,8 \times 10^7 - 5,9 \times 10^8$	$10^7 - 10^9$	8–10
<i>Lactobacillus spp.</i>	$5,8 \times 10^7 - 7,5 \times 10^8$	$10^5 - 10^8$	5–11
<i>Clostridium spp.</i>	$4,8 \times 10^4 - 6,4 \times 10^5$	10^2	10^4
II. Аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми			
<i>Escherichia coli</i> типова	$2,7 \times 10^7 - 1,4 \times 10^8$	$10^7 - 10^9$	$10^7 - 10^8$
<i>Escherichia coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	$5,5 \times 10^7 - 1,4 \times 10^8$	<25%	<25%

<i>Escherichia coli</i> лактозонегативна	0–8,8×10 ²	10 ²	10 ²
<i>Escherichia coli</i> , яка володіє гемолітичною активністю	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	2,6×10 ⁴ –8,8 ×10 ⁵	10 ⁵ –10 ⁷	10 ⁷ –10 ⁸
<i>Proteus</i> spp.	-	10 ² –10 ⁴	10 ²
<i>Citrobacter</i> spp	0–1,2×10 ²	10 ² –10 ⁴	10 ²
<i>Enterobacter</i> spp.	0–1,4×10 ⁴	10 ² –10 ⁴	10 ² –10 ⁴
<i>Klebsiella</i> spp.	0–2×10 ²	10 ² –10 ⁴	10 ²
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	10 ² –10 ⁴	10 ²
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	?	10 ² –10 ⁴	10 ² –10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	0–1,3×10 ²	10 ³ –10 ⁵	10 ²
<i>Candida</i> spp.	0–2,0×10 ⁵	10 ² –10 ⁵	10 ²
<i>Candida albicans</i>	?	10 ²	10 ²

Примітка:* – Гадзевич та ін., 2012; Білан, Лецова, 2022

Серодіагностика застосовується як додаткове дослідження (РА, РЗК).

Таким чином, визначення якісних та кількісних показників надзвичайно важливо для розуміння стану мікрофлори кишечника макроорганізмів. Ці дані даватимуть змогу лікарям ветеринарної медицини виявити відхилення у складі біотопів хворих тварин, шляхом визначення наявності патогенних бактерій, гемолізуючих штамів мікроорганізмів та збільшення їх кількості.

3. ЯКІСНІ І КІЛЬКІСНІ ПОКАЗНИКИ МІКРОБІОТИ КИШЕЧНИКА ЩУРІВ ЗА ВПЛИВУ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН НА ТЛІ НЕЗБАЛАНСОВАНОГО РАЦІОНУ

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacillus* формували основу всіх виділених мікроорганізмів контрольної та дослідних груп щурів (по 14%). Патогенної мікрофлори (шигели і сальмонели) та гемолітичних штамів бактерій не виявлено у жодної групи. Кількість біфідобактерій у тварин контрольної групи досягала в основному 10^{10} та лактобактерій – 10^8 – 10^9 КУО/г, що відповідало референс-показникам фекального біоптату лабораторних щурів. У цієї ж групи тварин серед представників факультативної мікрофлори майже 13% виділено представників типової кишкової палички. Кількість інших мікроорганізмів факультативної та транзиторної мікрофлори становила від 2 до 6% (табл. 4).

Таблиця 4 – Кількість мікроорганізмів (lg КОЕ/г фекалій) у групі щурів, що отримували незбалансований раціон із додаванням лікарських рослин ($x \pm SD$, $n = 5$)

Микрофлора кишечника	Контроль	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8.60 ± 0.40	8.20 ± 0.37	9.00 ± 0.55	8.00 ± 0.63
<i>Lactobacillus</i> spp.	8.20 ± 0.20	8.41 ± 0.41	8.88 ± 0.15	7.84 ± 0.26
<i>Escherichia coli</i> типова	7.78 ± 0.28	4.64 ± 0.26***	7.08 ± 0.64	4.81 ± 0.85*
<i>Escherichia coli</i> слабоферментуюча	3.60 ± 0.24	6.51 ± 0.73**	7.55 ± 0.62***	7.36 ± 0.51***
<i>Escherichia coli</i> лактозонегативна	1.34 ± 0.56	1.52 ± 0.43	0.36 ± 0.36	1.11 ± 0.68
<i>Enterococcus</i> spp.	6.26 ± 0.52	3.25 ± 1.33	3.54 ± 1.49	4.46 ± 0.62
<i>Clostridium</i> spp.	1.58 ± 0.40	1.20 ± 0.49	0.40 ± 0.40	1.20 ± 0.49
<i>Proteus</i> spp.	3.04 ± 0.07	2.08 ± 0.88	2.78 ± 1.15	2.04 ± 1.61
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.80 ± 0.20	1.99 ± 0.52	2.58 ± 0.70	3.08 ± 0.55
<i>Enterobacter</i> spp.	2.58 ± 0.24	2.65 ± 0.71	2.94 ± 1.81	2.06 ± 1.31
<i>Citrobacter</i> spp.	1.10 ± 0.45	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
<i>Klebsiella</i> spp.	2.99 ± 0.32	4.28 ± 0.37	4.96 ± 0.65	4.09 ± 0.89
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.26 ± 0.28	4.23 ± 0.24	4.87 ± 0.24	4.53 ± 0.28
<i>Pseudomonas</i> spp.	1.80 ± 0.49	2.28 ± 0.60	1.93 ± 0.81	0.72 ± 0.72
<i>Candida</i> spp.	3.30 ± 0.19	4.66 ± 0.05***	5.07 ± 0.52*	5.21 ± 0.27***
<i>Candida albicans</i>	2.54 ± 0.22	3.40 ± 0.93	2.06 ± 1.27	4.37 ± 1.10

Примітка: * – $P < 0.05$, ** – $P < 0.01$, *** – $P < 0.001$ порівняно з контрольною групою тварин

Слід зазначити, що у всіх дослідних тварин, які споживали лікарські рослини, не виявлено умовно-патогенних ентеробактерій роду *Citrobacter* ($P < 0,05$), проте прослідковувалося невірогідне збільшення кількості *Klebsiella* spp.

Трава *Salvia officinalis* викликала вірогідне зниження чисельності типової *Escherichia coli* ($P < 0,001$) та підвищення слабоферментуючої *Escherichia coli* ($P < 0,01$). Також збільшується кількість грибів роду *Candida* ($P < 0,001$). Проте зафіксували невірогідне зниження *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus aureus*.

Додавання до раціону щурів трави *Melissa officinalis* не змінило чисельності типової *Escherichia coli* та знижувало чисельність слабоферментуючих штамів цього виду бактерій ($P < 0,001$). Як і за впливу *Salvia officinalis*, у кишечнику щурів встановлено збільшення чисельності грибів роду *Candida* до 8% ($P < 0,05$). На тлі цього встановлено невірогідне зниження лактозонегативної *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp.

Додавання до раціону *Lavandula angustifolia* також знижує чисельність повноцінної *Escherichia coli* ($P < 0,05$) та збільшує чисельність слабоферментуючої форми цієї бактерії ($P < 0,001$). Також, як за інших видів рослин, достовірно збільшується чисельність грибів роду *Candida* до 9% ($P < 0,001$). Згодовування *Lavandula angustifolia* невірогідно знизило кількість *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. і підвищило чисельність *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*.

Додавання лікарських рослин (*Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, *Lavandula angustifolia*) до раціону лабораторних тварин суттєво змінило кількісне співвідношення *Escherichia coli* з нормальними та зміненими ферментативними властивостями. Чисельність типової *Escherichia coli* за згодовування *Salvia officinalis* і *Lavandula angustifolia* зменшилася в 1,7 і 1,6 рази; слабоферментуючої форми *Escherichia coli* навпаки збільшилася за згодовування всіх лікарських рослин у 1,8–2,1 рази відносно тварин, що споживали високожировий раціон. Не виявлено умовно-патогенних ентеробактерій роду *Citrobacter* ($P < 0,05$), проте спостерігалось достовірне збільшення чисельності грибів роду *Candida* ($P < 0,05$ і $P < 0,001$). Серед інших представників кишкової мікробіоти вірогідних змін не встановлено.

Таким чином, додавання лікарських рослин (*Salvia officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis*) до високожирового раціону лабораторних тварин не вплинуло на кількість біфідобактерій та лактобактерій, суттєво не змінило кількісне співвідношення *Escherichia coli* з нормальними та зміненими ферментативними властивостями у вмісті кишечника. У всіх дослідних групах не вдалося виділити умовно-патогенних ентеробактерій роду *Citrobacter* ($P < 0,05$), проте встановлено збільшення чисельності грибів роду *Candida*.

ВИСНОВКИ

1. Первинний посів матеріалу здійснюється на універсальні живильні середовища, призначені для виділення аеробних та анаеробних бактерій, які інкубуються за 24 та 37°C протягом 24–72–96 год. Виділення чистих культур і їх первинна диференціація проводиться шляхом вивчення тинкторіальних, культуральних властивостей й морфології бактерій у всіх різновидів колоній, що виростили на середовищах первинного посіву. Визначається кількість різновидів бактерій в 1 мл (г) фекалій. Після мікроскопії мазків, зафарбованих за Грамом, матеріал з підозрілих колоній для накопичення чистої культури висівається на скошений МПА. Остаточна ідентифікація культур проводиться з визначенням ферментативних властивостей (здатність утилізувати різні вуглеводи, цитрат, утворювати ацетоїн або суміш кислот при ферментації глюкози (тести Фогеса-Проскауера і з метиленовим червоним), уреазна активність, утворення індолу, сірководню, декарбоксілювання і дезамінування амінокислот; рухливості та визначення антигенної структури в РА.

2. Представники головної аутофлори (*Bifidobacterium* і *Lactobacillus* spp.) виконують важливу неспецифічну захисну функцію, сприяючи підтримці сталості біохімічного, біологічного середовища травного тракту, беруть участь у захисній та травній функціях. Це група бактерій з вираженими цукролітичними властивостями, що культивуються на спеціальних живильних середовищах.

Залишкова мікрофлора становить не більше 1% біоценозу (аеробна сапрофітна та умовно-патогенна флора – ентерококи, ентеробактерії, стафілококи, протей, дріжджі тощо). На належність виділених мікроорганізмів до родини Enterobacteriaceae вказують морфологічні ознаки: грамнегативні палички із закругленими кінцями, без спор, як правило, безладно розташовані; факультативні анаероби, які не вибагливі до живильних середовищ і утворюють характерні колонії за 37°C; володіють каталазною і нітратредуктазною активністю та оксидазонегативні; ферментують і окисляють глюкозу. На середовищі Ендо лактозопозитивні ентеробактерії формують темно-малинові або червоні колонії, лактозонегативні – безбарвні, каламутні або прозорі. Бактерії роду *Proteus* – грамнегативні дрібні палички, які формують повзучий ріст. Лактозонегативні, зброджують глюкозу з утворенням газу, переважно гідролізують сечовину.

Гемолізуючі види бактерій на 5 % кров'яному агарі здатні формувати середні круглі, вологі колонії із зоною α чи β гемолізу; деякі штами *Serratia marcescens* мають червоний пігмент.

Ідентифікація кокової флори проводиться за морфологією, здатністю синтезувати коагулазу, каталазу та лецитиназу, відновлювати нітриту, утворювати H_2S , розкласти глюкозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, гліцерин, маніт із виділенням кислоти.

3. У дослідах на лабораторних тваринах, яким додавали до високожирового раціону 5% сухої тави *Salvia officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* встановлено суттєві зміни кількісного співвідношення *Escherichia coli* з

нормальними та зміненими ферментативними властивостями у вмісті кишечника. Чисельність типової *Escherichia coli* за згодовування *Salvia officinalis* і *Lavandula angustifolia* зменшилася в 1,7 і 1,6 рази; слабоферментуючої форми *Escherichia coli* навпаки збільшилася за згодовування всіх лікарських рослин у 1,8–2,1 рази відносно до контролю. На тлі додавання лікарських рослин до раціону, не вдалося виділити умовно-патогенних ентеробактерій роду *Citrobacter* ($P < 0,05$), проте спостерігали збільшення чисельності грибів роду *Candida* ($P < 0,05$ та $P < 0,001$).

ЛІТЕРАТУРА

1. Андрианова Т.В., Бобир В.В., Виноград Н.А. та ін. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підруч. для студ. вищ. навч. заклад. під ред. В.П. Широбокова. Вінниця: Нова Книга. 2015. 856 с.
2. Бекташева О.Р., Лаврентьева К.В., Черевач Н.В., Вінніков А.І., Москаленко А.А. Біологічні властивості бактерій родини *Enterobacteriaceae* – збудників гнійно-запальних захворювань у дітей. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. 2011. № 2(1). С. 12–17.
3. Білан М.В., Лещова М.О. Корекція мікробіоти кишечника під впливом ксенобіотиків та імуностимуляторів. Монографія. Дніпро, Ліра. 2022. 128 с
4. Гадзевич Д.В., Дунаєв Ю.К., Горбенко О.В., Гадзевич О.В., Вовк С.І. Видовий склад мікрофлори шлунково-кишкового тракту великої рогатої худоби, хворої на ентерит. Ветеринарна медицина. 2012. № 96. С. 99-102. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vetmed_2012_96_38.
5. Зажарський В.В., Білан М.В., Алексеєва Н.В., Сосницький О.І., Кулішенко О.М., Глебенюк В.В., Усеєва Н.Г., Козак Н.І., Галатюк О.Є., Бегас В.Л., Аліфонова К.В. Діагностика інфекційних та протозойних хвороб тварин: навчальний посібник. Дніпро: ГРАНІ. 2023. 300 с.
6. Камінська М. В. Комплексний метод визначення складу мікрофлори кишковика лабораторних тварин. Сільськогосподарська мікробіологія. 2015. №22. С. 60–65.
7. Мінухін В.В., Коваленко Н.І., Замазій Т.М. Модуль 3. Частина 3. Умовно-патогенні мікроорганізми: метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю "Лабораторна діагностика". Харків: ХНМУ, 2014. 48 с.
8. Путніков А. В., Голота Ю. В., Сергійчук Т. М., Остапчук А. М., Закордонець Л. В., Остапченко Л. І., Толстанов Г. М. Кількісні та функціональні показники кишкової нормобіоти щурів. Мікробіологія і біотехнологія. 2015. С. 89–100.
9. Ушкалов В. О., Бердник В. П., Мачуський О. В., Ковтун В. А., Тимченко О. В. *Citrobacter* – найближчий родич сальмонели. Ветеринарна біотехнологія. 2015. 26. 205–214.
10. Bilan M. V., Lieshchova M. A., Tishkina N. M., Brygadyrenko V. V. Combined effect of glyphosate, saccharin and sodium benzoate on the gut microbiota of rats. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. 10(2). P. 228–232. <https://doi.org/10.15421/021934>
11. Bilan M. V., Lieshchova M. A., Brygadyrenko V. V., Podliesnova V. E. The effect of polystyrene foam on the white mice's intestinal microbiota. *Microbiological Journal*. 2022. №84(5). P.10–20. <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.05.010>
12. Fischetti V. A., Novick R. P., Ferretti J. J., Portnoy D. A., Braunstein M., Rood October J. I. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 5th Edition. 2019. Washington, DC. 1212.

13. Hansen A. K., Nielsen D. S. Handbook of Laboratory Animal Bacteriology. 2015. CRC Press. 295.
14. Kogut M. H., Zhang G. Gut microbiota, immunity, and health in production animals. The Microbiomes of Humans, Animals, Plants, and the Environment. 2022. №4. P. 329. https://doi.org/10.1007/978-3-030-90303-9_15
15. Lieshchova M. A., Brygadyrenko V. V. Influence of *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Vitex angus-castus* on the organism of rats fed with excessive fat-containing diet. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2021. № 12(1). P. 169–180. <http://dx.doi.org/10.15421/022125>

