Российская академия сельскохозяйственных наук

Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных

Б.В. Тараканов

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦЫ

ВНИИФБиП с.-х. животных

Боровск, 1998

ББК 28. 4
Т19
УДК 636:612.3:579:57.083

В книге с учетом современного уровня знаний описаны основные принципы и методы, используемые при изучении микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных как на уровне надвидового микробного сообщества, так и отдельных чистых культур.

В руководство включены как общеизвестные методы, используемые в лаборатории биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта ВНИИФБиП с.-х. животных при изучении различных аспектов микробиологии рубца жвачных и пищеварительного тракта свиней и птицы, так и разработанные в процессе исследований.

Пособие предназначено для научных сотрудников и аспирантов НИИ и ВУЗов сельскохозяйственного профиля.

Замечания и предложения по дальнейшему усовершенствованию настоящего издания просим присылать по адресу: Россия, 249010. г. Боровск, Калужской обл., ВНИИФБиП с.-х. животных.

Автор: Тараканов Борис Васильевич, заслуженный деятель науки РФ, доктор биологических наук, профессор.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Питание сельскохозяйственных животных и птицы осуществляется при активном участии микроорганизмов, обитающих в пищеварительном тракте. Они гидролизуют сложные полимерные соединения растительных кормов, образуют энергетические, пластические и биологически активные соединения, необходимые для обеспечения жизнедеятельности и продуктивных функций животных. В этом аспекте сравнительно лучше изучена микрофлора рубца. Своеобразие условий обитания в этой экологической нище (анаэробиоз, низкий окислительно-восстановительный потенциал, конкуренция за питательные вещества, постоянный проток содержимого, синтрофизм и т.д.) наложило определенный отпечаток на физиологию и биохимию популяций бактерий, простейших и поведение как суммарной микрофлоры (надвидового микробного сообщества), так и отдельных ее видов.

Главная задача пособия состоит в том, чтобы дать читателю и, в первую очередь, начинающим микробиологам сведения об особенностях работы с микроорганизмами пищеварительного тракта.

Исходя из поставленной задачи, в книге с учетом современного уровня знаний описаны основные принципы и методы, используемые при изучении микрофлоры преджелудков у жвачных, подробно представлена техника взятия проб содержимого рубца у жвачных животных для микробиологических исследований. Детально рассмотрены возможности методов in vitro и техника проведения исследований при изучении смешанных ассоциаций рубцовых микроорганизмов. Представлены рецепты основных, наиболее широко используемых, буферных растворов и питательных сред.

В разделе «Простейшие рубца и методы их изучения» рассмотрено строение простейших, дано описание голотрих и четырех родов энтодиниоморф рубца, достаточное для их родовой идентификации, представлены методы фиксации и окраски инфузорий, их выделения и культивирования.

Подробно изложены основные принципы работы со строго анаэробными бактериями рубца, представлена рецептура питательных сред для наиболее важных физиологических групп и отдельных видов, методы исследования физиолого-биохимических свойств у чистых культур бактерий и определения активностей ферментов целлюлазного комплекса, амилазы и др. Описаны подходы и методы исследования анаэробных целлюлозолитических грибов.

Одним из важнейших этапов работы с микроорганизмами является их идентификация. Однако отечественные определители микробов Циона и Красильникова не содержат информации об облигатных анаэробах рубца жвачных. За рубежом в последние годы были изданы Берги - 8 (1974) и Берги - 9 (1986), которые в настоящее время являются лучшими определителями микроорганизмов. Однако ограниченная доступность оригинального издания Берги, распыленность информации о микроорганизмах рубца по периодическим и продолжающимся издани-

ям побудили включить в настоящее пособие описание основных родов и видов анаэробных микроорганизмов рубца, что, по нашему мнению, значительно облегчит работу по идентификации.

Автор выражает свою глубокую признательность и благодарность И.А. Долгову и Т.А. Николичевой за помощь в подготовке пунктов 4.1.1., 4.5., 4.6., 4.18, 4.19 и 3.2.6., 3.3. соответственно.

1. ТЕХНИКА ВЗЯТИЯ ПРОБ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА У ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ТРАНСПОРТИРОВКА В ЛАБОРАТОРИЮ

Метод отбора средней пробы рубцового содержимого может существенно повлиять на результаты количественных и качественных исследований микрофлоры рубца.

Несмотря на то, что под влиянием перистальтических сокращений рубца его содержимое постоянно перемешивается, установлено, что концентрация отдельных компонентов в разных участках рубца неодинакова (5). Поэтому, при отборе средней пробы нужно стремиться, чтобы она действительно отражала истинную картину исследуемого материала в целом.

Как отмечают некоторые авторы (2), для получения идеального среднего образца нужно было бы взять все содержимое рубца, тщательно перемешать его и только тогда отобрать среднюю пробу. Однако этот прием, связанный с убоем животного, в повседневной научно-исследовательской работе не пригоден, и поэтому для отбора проб рубцового содержимого при жизни животных обычно применяют два метода: 1) получение содержимого через фистулу рубца; 2) отбор проб содержимого рубца с помощью пищеводного зонда.

Выбор того или другого метода зависит от целей и характера эксперимента, его продолжительности, количества животных, частоты исследований и др.

При взятии исследуемого материала через фистулу или пищевод мы обычно пользуемся резиновыми зондами соответствующей длины и диаметра, соединенными с колбами Бунзена, в которых создается вакуум с помощью насоса Комовского. При получении содержимого рубца через фистулу вводят зонд 4 - 5 раз на разную глубину и из каждого участка рубца берут небольшие порции по 40 - 50 мл, которые затем тщательно перемешивают в одной колбе.

Для того, чтобы извлеченный материал как можно меньше соприкасался с воздухом, колбу наполняют содержимым доверху и закрывают резиновой пробкой или заливают стерильным вазелиновым маслом.

Для взятия проб рубцового содержимого у овец используют обычно желудочные зонды, изготовляемые промышленностью. При их отсутствии хорошие зонды могут быть изготовлены из эластичной вакуумной трубки с наружным диаметром 1,5 - 1,7 см и внутренним 0,7 - 0,9 см. Длина зонда в зависимости от размеров животного может варьировать от 130 до 150 - 160 см, а желудочный конец должен быть снабжен 5 - 8 отверстиями в боковых стенках, чтобы в момент отбора содержимого не происходило его закупоривания.

У ягнят в первые 10 дней после рождения содержимое рубца берут с помощью мягкой резиновой трубки диаметром 0,5 - 0,7 см, которую соединяют со шприцем Жане.

Чтобы избежать попадания слюны в просвет зонда и не применять зевник, можно вводить зонд в рубец животных по носоглоточному каналу. Эту методику мы использовали при работе с телятами вплоть до 6-месячного возраста (1). С первых дней жизни и до 45 - 50-дневного возраста телят в качестве носоглоточного зонда используют обычную резиновую трубку с наружным диаметром 0,7 см, внутренним 0,4 см и длиной 130 - 135 см. Трубка должна быть из упругой резины.

С 45 - 50-дневного возраста, когда в рубце телят появляется значительное количество грубых частиц, наружный диаметр зонда увеличивают до 0,9 см, а внутренний до 0,5 см. На боковых стенках желудочного зонда дополнительно делают несколько отверстий диаметром 0,5 - 0,7 см, что способствует предохранению зонда от закупоривания крупными кормовыми частичками.

Техника введения зонда довольно проста. Теленка фиксируют в стоячем положении, удерживая его за шею, после этого левой рукой раскрывают вход в левую или правую половину носовой полости, а правой рукой вводят зонд, смазанный стерильным вазелиновым маслом, по нижнему носовому входу до глотки и затем по пищеводу в рубец на общую глубину до 80 - 110 см. В среднем на всю операцию получения рубцового содержимого затрачивают 8 - 10 минут.

У молодняка крупного рогатого скота старше 6 мес. и у взрослых коров для взятия содержимого используют резиновый шланг с кордовой основой и внутренним диаметром около 2 см. В этом случае рубцовое содержимое при отрыжке выделяется самотеком.

Стерилизацию зондов и резиновых пробок осуществляют в автоклаве при давлении в 1 атм. в течение 30 мин, а стеклянной посуды - обычными методами.

Известно, что рубцовые бактерии являются преимущественно строгими анаэробами и весьма чувствительны к изменениям условий окружающей среды, и в особенности к контакту с воздухом. Они требовательны к условиям культивирования, а увеличение промежутка времени между взятиями проб из преджелудков и их посевом на питательные среды ведет к снижению количества вырастающих колоний (3,4). Поэтому при проведении исследований необходимо иметь в виду, чтобы животные находились в непосредственной близости от лаборатории и на транспортировку исследуемого материала уходило немного времени. В этом случае температуру рубцового содержимого до посева поддерживают в пределах 37 - 39°С. Если же промежуток времени между взятием проб и их высевом на питательные среды достигает часа и более, то исследуемый материал помещают в термос со льдом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тараканов Б.В. К методике получения рубцового содержимого у телят-молочников. Труды ВНИИФБиП с.-х. жив., 1965, 2: 250-257.

2. Хобсон П.Н. Методы подсчета микроорганизмов в содержимом рубца. В кн.: Физиологические основы кормления жвачных животных. М.: Колос, 1964: 82-92.

3. Bryant M.P.,Burkey L.A. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacterial in the bovine rumen. J. Dairy Sci., 1953, 36: 205-217.

4. Hungate R.E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Rev., 1950, 14: 1-49.

5.Hungate R. E. The rumen and its microbes. Academic Press, New-York, London, 1966.

2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ IN VITRO ПРИ ИЗУЧЕНИИ СМЕШАННЫХ АССОЦИАЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА ЖВАЧНЫХ

Обмен веществ у жвачных и микробных популяций, обитающих в преджелудках, определенным образом взаимосвязан, но по ряду показателей эти две системы могут изменяться и функционировать почти независимо друг от друга. Поэтому изучение активности суммарной (бактерии + простейшие) микрофлоры рубца в отрыве от метаболизма животного чревато искажениями в представлениях о роли микроорганизмов в обменных функциях. Это побудило исследователей изучать деятельность микрофлоры рубца несколькими методами, что привело к интенсивной разработке и широкому использованию в разных странах самых разнообразных методов. Разработка общих методов исследований, позволяющих получать сравнимые данные, представляется актуальной и в настоящее время. По отдельным направлениям такие методы могли бы оказаться неоценимыми при изучении биохимических процессов, связанных с функционированием рубцовых микроорганизмов.

Эти методы исследования могут быть подразделены на две основные категории: методы in vitro и методы in vivo. При использовании методов in vitro микроорганизмы полностью изолированы от влияния животного-хозяина, тогда как методы in vivo предусматривают частичное контролирование влияния окружающей среды и хозяина. Так или иначе, но для получения наиболее полной и объективной информации об основных биохимических процессах, происходящих в микробных популяциях рубца, и факторах, их регулирующих, необходимо использовать оба эти взаимодополняющие друг друга метода. Однако в связи с небольшим объемом настоящего издания мы остановимся только на освещении методов in vitro.

Выбор той или иной методики in vitro для изучения функций микрофлоры определяется прежде всего целями эксперимента. Еще в 1963 году Джонсон (29) сформулировал перспективы использования методов in vitro и предложил прибегать к ним при изучении следующих вопросов:

1. Переваривание клетчатки и изучение влияющих на него факторов;
2. Использование небелкового азота;
3. Межуточный обмен веществ в отдельных популяциях и смешанных микробных ассоциациях;
4. Изучение симбиозов при периодическом и непрерывном методах культивирования;
5. Оптимизация условий, необходимых для динамического равновесия микробных популяций;
6. Изучение питательной ценности кормов;
7. Изучение биоэнергетики рубцовой ферментации.

Естественно, что перечисленные аспекты не исчерпывают всех возможностей в использовании методов in vitro и они могут быть значи-

тельно дополнены. В настоящее время при изучении жизнедеятельности микрофлоры преджелудков используются две системы: система непрерывной ферментации и замкнутая система.

2.1. СИСТЕМА НЕПРЕРЫВНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

Этот метод позволяет в известной степени моделировать пищеварительные процессы в рубце, так как предусматривает непрерывную подачу в ферментационный сосуд питательных веществ, поддерживание в определенных пределах pH и окислительно-восстановительного потенциала, удаление конечных продуктов обмена. Аппараты для непрерывного культивирования микроорганизмов имеют различную степень сложности, и поэтому работа с ними требует определенных инженерных знаний. Несмотря на относительную сложность метода, при правильном проведении экспериментов он дает возможность изучать микробиологические процессы в условиях, максимально приближенных к животному организму. В системе непрерывной ферментации можно воспроизводить процессы синтеза и абсорбции, а также изучать влияние условий кормления на анаболические и катаболические процессы в микробных ассоциациях и чистых культурах. При этом биохимические исследования желательно дополнять микроскопическими исследованиями развития микробных популяций, подсчетом бактерий или определением оптической плотности суспензий в случае использования в питательной среде легкорастворимых компонентов. При соблюдении всех этих условий можно получить достоверные данные о микробиологических процессах в рубце. Однако результаты исследований, особенно при изучении интенсивности биосинтеза и всасывания, должны экстраполироваться на организм животного с известной осторожностью. Другим серьезным недостатком метода непрерывного культивирования можно считать его сложность и невозможность проведения большого количества экспериментов

Несмотря на отмеченные недостатки, метод непрерывной ферментации за рубежом использовался в опытах многих исследователей (3, 7, 18, 19, 21, 22, 31, 33, 34, 35, 36, 37). В 1974 году Эверт (16) опубликовал обзор, в котором рассматриваются и сравниваются различные системы для непрерывного культивирования рубцовых микроорганизмов.

В нашей стране изучение рубцовых микроорганизмов методом непрерывного культивирования до настоящего времени проводилось лишь отдельными исследователями, хотя технические возможности для этого имеются. По нашему мнению, при исследовании как смешанных популяций бактерий и простейших преджелудков, так и чистых культур целесообразно испытать выпускаемые в России аппараты непрерывного культивирования микроорганизмов.

2.2. ЗАМКНУТАЯ СИСТЕМА ФЕРМЕНТАЦИИ

В противоположность непрерывной, эта система ферментации не предусматривает систематического добавления свежей питательной среды или удаления продуктов метаболизма в процессе культивирования, в связи с чем она является простой и позволяет проводить большое количество исследований в одной серии опытов. Эта техника довольно широко используется при количественном изучении ферментативных и синтетических процессов в смешанных и чистых популяциях микроорганизмов, при изучении их пищевых потребностей и т.д. При использовании замкнутой системы ферментации всегда нужно следить соответствует ли культивируемая in vitro микрофлора микробным популяциям в рубце у животного. В этом заключается и главный недостаток замкнутой системы. Следует отметить, что Дехорити и соавт. (13), Эль-Шазли и соавт. (14, 15) в серии опытов убедительно показали, что бактерии, культивируемые in vitro, не отличаются от тех микроорганизмов, которые обитают в преджелудках жвачных. Тем не менее, необходимо иметь в виду возможность отклонений от обычного хода обмена веществ у микроорганизмов, культивируемых в замкнутой системе in vitro, так как при изучении смешанной культуры рубцовых бактерий простейшие почти всегда исключаются.

2.3. ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ IN VITRO

Метод in vitro при изучении деятельности рубцовой микрофлоры применяется уже давно. В связи с его сравнительно широкими возможностями условия проведения экспериментов в каждом конкретном случае (изучение роли микрофлоры в использовании небелкового азота, определение переваривания клетчатки, изучение пищевых потребностей микроорганизмов и т.д.) могут значительно изменяться. В связи с этим мы считаем необходимым кратко остановиться на рецептуре буферных растворов, питательных сред и других приемов, наиболее широко используемых при проведении исследований in vitro.

2.3.1. Буферные растворы и питательные среды

В подавляющем большинстве исследований по ферментации in vitro чаще всего используют стандартную буферную среду, основой которой является раствор Мак-Доугалла (25). Этот раствор по своему составу имитирует слюну овец и во многих опытах его применяют в качестве единственной буферной среды. В состав искусственной слюны по Мак-Доугаллу входят следующие соли (г/литр): $NaHCO_3$ - 9,8; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ - 9,3; NaCl - 0,47; KCl - 0,57; $CaCl_2$ (безводный) - 0,04 и безводный $MgCl_2$ - 0,06.

При решении частных задач в основную буферную среду вводят дополнительные минеральные элементы и другие пищевые и ростовые факторы. Так например, Барроугс и соавт. (9, 10) предложили среду с более широким спектром макро- и микроэлементов, которая после мо-

дификации Ченгом и соавт. (11) получила следующий состав (г/2 литра): Na_2HPO_4 - 0,631; KH_2PO_4 - 0,303; $NaHCO_3$ - 5,25; KCl - 0,75; NaCl - 0,75; $MgSO_4$ - 0,225; $CaCl_2$ - 0,075; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,015; $MnSO_4$ - 0,008; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,008; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,004; $CoCl_2$ - 0,002 и мочевина - 2,0.

При изучении переваримости клетчатки и углеводов методами in vitro в состав среды необходимо включать азотосодержащие вещества. В настоящее время в лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП с.-х. животных при определении целлюлозолитической активности рубцового содержимого используют среду следующего состава (мг/литр): NH_2PO_4 - 2041,6; $NaHCO_3$ - 2041,6; KCl - 262,4; KJ - 28,03; NaCl - 262,4; $MgSO_4$ - 87,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 31,2; $MnSO_4$ - 15,6; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 1,6; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,47; $CoSO_4$ - 0,7; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ - 0,07; $SrCl_2 \cdot 5H_2O$ - 0,16; $KCrO_4$ - 0,08; $NaAsO_3$ - 0,13; глюкоза - 500 и мочевина - 840; pH среды 6,8 - 7,2.

С тех пор как у целлюлозолитических микроорганизмов рубца была установлена потребность в определенных жирных кислотах с короткой цепью и биотине (4, 5, 8,) валериановая кислота и биотин стали стандартными ингредиентами питательных сред при определении переваримости целлюлозы. Предложенная Бентли и соавт. (6) для изучения целлюлозолитических микроорганизмов среда с ростовыми факторами имеет следующий состав (г/100 мл): целлюлоза - 1,0; мочевина - 0,168; глюкоза - 0,1; Na_2HPO_4 - 0,113; NaH_2PO_4 - 0,109; KCl - 0,043; $MgCO_3$ - 0,04; $CaCl_2$ - 0,004; Na_2SO_4 - 0,015; Na_2CO_3 - 0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,044; парааминобензойная кислота - 50 мкг и биотин - 20 мкг; pH среды регулируется до 6,7 - 6,9 насыщенным раствором карбоната натрия.

В связи с тем что высокие концентрации мочевины оказались токсичными для целлюлозолитической микрофлоры рубца, Дехорити и соавт. (12) снизили дозу мочевины в среде Бентли с 0,168 до 0,126г на 100 мл среды, а Джонсон и соавт. (28) ввели в нее валериановую кислоту (30 мг/100 мл). В конечном счете , эти авторы для исследований in vitro предложили среду, известную под названием среды «Огайо».

Состав среды «Огайо» (30)

Ингредиенты	мл/100 мл среды
Na_2Co_3, 200мг/мл	1,0
Раствор минеральных веществ[x]	2,0
$FeCl_3$, 4,4 мг/мл	1,0
$CaCl_2$, 5,29 мг/мл	1,0
Мочевина, 126 мг/мл	1,0
Биотин, 10 мкг/мл	2,0
Валериановая кислота, 5 мг/мл	5,0

[x]) Раствор минеральных веществ состоит из следующих солей (г/литр): Na_2HPO_4 - 56,5; NaH_2PO_4 - 54,5; KCl - 21,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 5,82; K_2SO_4 - 7,5; NaCl - 21,5

Валериановая кислота и биотин, являющиеся факторами роста для целлюлозолитических микроорганизмов, особенно необходимы для ра-

боты с отмытыми клеточными суспензиями и обычно добавляются в большинство сред, используемых не только для изучения переваримости клетчатки. Что касается парааминобензойной кислоты, то Дехорити и соавт. (13) показали, что потребность в ней у целлюлозолитических бактерий является второстепенной. По этой причине без ущерба для микробной активности она может быть исключена из питательной среды. Следует также иметь ввиду, что большая часть необходимых микроэлементов и других ростовых факторов поступает с содержимым рубца, если последнее является обязательным компонентом среды или в значительных количествах вводится с посевным материалом.

Аналогичные среды используют и в опытах по изучению биосинтетической активности рубцовой микрофлоры. Так, в опытах Гила и соавт. (17) по изучению биосинтеза бактериального протеина рубцовыми микроорганизмами из мочевины и глюкозы, крахмала или целлюлозы питательная среда содержала 128,6 мл искусственной слюны по Мак-Доугаллу, 7 мл раствора валериановой кислоты (5 мг/мл), 0,7 мл раствора парааминобензойной кислоты (50 мкг/мл); 2,8 мл раствора биотина (10 мкг/мл); 1мл раствора мочевины (126 мг/мл) и в качестве посевного материала 20 мл рубцовой жидкости после центрифугирования при 250g в течение 10 мин; pH среды регулируют до 6,9 с помощью Na_2CO_3. Другую модификацию буферного раствора при изучении скорости микробного роста использовали Мэнг и соавт. (24).

Состав буферного раствора по Мэнг и соавт. (24)

Ингредиенты	Количество
	г/литр
Na_2HCO_3	8,75
Макроминералы:	
Na_2HPO_4, безводный	1,42
KH_2PO_4, безводный	1,55
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,15
Микроминералы:	мг/литр
$CaCl_2$, безводный	16,25
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	12,50
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,25
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10,00

Для приготовления буфера отдельно готовят раствор микроминералов (г/100 мл дистиллированной воды): $CaCl_2$ - 16,25; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 12,5; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ - 1,25 и $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 10,0 и 0,1 мл этого раствора добавляют на 1 литр буфера.

При приготовлении питательной среды в качестве источников азота и энергии используют мочевину (117 мг/100 мл) и глюкозу или целлобиозу (1 г/100 мл) соответственно.

2.3.2. Подготовка материала для исследований

Этот этап является важнейшим, так как от тщательности отбора и подготовки рубцового содержимого к посеву зависит вариабельность результатов опыта, его точность. При этом основное внимание должно быть уделено взятию рубцового содержимого от животного и способу его подготовки к посеву.

Что касается отбора проб для исследований, то в литературе (7, 37) подчеркивается необходимость применения посевного материала от животного, которому скармливают рацион, сходный с изучаемым in vitro. При изучении ферментации крахмала содержимое рубца для исследований in vitro берут от животных, в рационе которых преобладающим углеводом является крахмал. Аналогичные требования должны соблюдаться при изучении переваримости клетчатки и в других исследованиях в связи с тем, что в микробных популяциях рубца может быстро изменяться соотношение в зависимости от субстрата или типа рациона, скармливаемого животным.

В последние годы методика in vitro нашла широкое применение при оценке переваримости грубых кормов. Для этого многие исследователи считают необходимым стабилизировать микробные популяции в рубце у животных доноров содержимого путем кормления однообразным грубым кормом в течение года или более продолжительное время. Такая подготовка животных позволяет добиться минимальной вариабельности данных, полученных с содержимым рубца, взятым в разные дни. Это имеет особое значение в том случае, когда предполагается сравнивать количественные данные за длительный период.

При необходимости изучения потребностей смешанных ассоциаций рубцовых микроорганизмов в питательных веществах и ростовых факторах нужно знать весь спектр веществ, которые вносятся в инкубационную среду вместе с рубцовой жидкостью. Однако по техническим причинам часто это является трудновыполнимым и с целью получения очищенного посевного материала исследовательская практика пошла по пути выделения микробных ассоциаций из рубцового содержимого с помощью центрифугирования и отмывания буферными растворами. Впервые выделение микробных клеток из рубцового содержимого с помощью центрифугирования было применено Мак-Наутом (26) при изучении использования небелкового азота. Несколько позднее центрифугирование содержимого было широко использовано при изучении переваривания клетчатки Бентли и соавт. (4, 5, 6). В их опытах процеженное через марлю рубцовое содержимое центрифугировали, а полученный из 1 л жидкости осадок суспендировали в 200 мл фосфатного буфера (pH 7,0), который содержал 0,01% солянокислого цистеина, и 8 мл этой суспензии использовали в качестве посевного материала на 100 мл среды.

Ченг и соавт. (11) разработали методику получения суспензии отмытых клеток. Эти авторы центрифугируют рубцовое содержимое (1200 мл) в течение 1 мин при 1000 об/мин. Осевшие кормовые частички и простейшие выбрасывают, а надосадочную жидкость затем центрифу-

гируют со скоростью 5000 об/мин - 20 мин. Осадок, состоящий преимущественно из бактерий, суспендируют в 360 мл дистиллированной воды или фосфатного буфера (pH 7,0) и снова центрифугируют 20 мин при 5000 об/мин. Отмывание повторяют еще раз. Конечный осадок микроорганизмов суспендируют в 600 мл питательной среды. К бактериальной суспензии в среде добавляют 3 г очищенной целлюлозы (Solka-Flok) и используют в опытах по изучению влияния различных факторов на переваривание целлюлозы.

Другую модификацию приготовления суспензии рубцовых микроорганизмов для переваривания клетчатки в условиях in vitro предложили Джонсон и соавт. (28). По этой методике отжатую в прессе под большим давлением рубцовую жидкость выбрасывают, а оставшуюся часть смешивают с фосфатным буфером (pH 7,0) в соотношении 1,2:1, умеренно встряхивают и вторично отжимают. Полученную жидкость фильтруют через марлю и центрифугируют, а ресуспендированный в буфере осадок используют в качестве инокулята.

Дехорити и соавт. (13) разработали методику выделения целлюлозолитической фракции рубцовых микроорганизмов с помощью дифференциального центрифугирования. Для центрифугирования в этом случае используют клеточную суспензию, полученную путем отмывания плотной части рубцового содержимого по Джонсону и соавт. (см. выше). Максимальная целлюлозолитическая активность была связана с микробной фракцией, осаждающейся при центрифугировании между 1500 и 3000 g.

Отмытые микробные клетки содержимого рубца использовали Мэнг и соавт. (24) при изучении влияния различных соотношений аминокислотного и небелкового азота в среде на биосинтез микробного белка. Отмытые клеточные суспензии готовят следующим образом. Процеженную через 4 слоя марли рубцовую жидкость центрифугируют при 164 g в течение 10 мин, и затем процеживают через 20 слоев марли, чтобы удалить плавающие частички. Фильтрат центрифугируют при 23000 g 15 мин. Надосадочную жидкость выбрасывают, а осадок суспендируют в атмосфере углекислого газа в насыщенном CO_2 рубцовом буферном растворе (см. выше) и снова центрифугируют при 23000 g в течение 15 мин. Отмытые клетки, полученные из двух объемов рубцового содержимого, суспендируют в одном объеме насыщенного углекислотой буферного раствора и 15 мл суспензии добавляют к 100 мл питательной среды, в состав которой включались различные источники азота, а также глюкоза или целлобиоза.

Следует отметить, что отмывание рубцовых микроорганизмов хотя и является необходимой операцией, обеспечивающей их очистку от питательных и ростовых факторов содержимого, оно может приводить к инактивации микробных клеток за счет контакта с кислородом воздуха и воздействия неблагоприятных температур. Так, например, в опытах Джонсона и соавт. (28) двукратное отмывание клеточной суспензии, полученной из плотной части рубцового содержимого, сопровождалось

полной потерей микроорганизмами способности переваривать клетчатку. Поэтому отмывание нужно проводить очень осторожно с максимально возможным устранением неблагоприятных факторов, воздействующих на микрофлору. Кроме того, при использовании в опытах in vitro отмытых микробных клеток необходимо удовлетворять потребность последних в ростовых факторах, так как в противном случае их активность снижается вплоть до полной инактивации.

2.3.3. Сосуды для ферментации и отбор проб

Для проведения исследований in vitro в замкнутой системе используют сосуды любого типа, но наиболее предпочтительны широкогорлые и плоскодонные конические колбы. В зависимости от целей эксперимента их объем может изменяться от 50 до 1000 мл. При работе с меньшими объемами ферментационной среды мы используем стеклянные пробирки размером 20×180 мм.

При изучении переваримости клетчатки наиболее удобно пользоваться такими сосудами и системами, которые обеспечивают наименьшее количество переносов субстрата. Так, например, Хершбергер с соавт. (20) в качестве ферментационных сосудов использовали калиброванные центрифужные пробирки и предложили быстрый метод определения целлюлозы.

При необходимости изучения почасовой динамики ферментации пользуются сосудами большего объема. В этом случае пробы отбирают после тщательного перемешивания в установленные интервалы времени. Пипетку используют с широким отверстием, чтобы можно было взять волокнистые частицы. С целью предотвращения контакта среды с кислородом воздуха во время отбора проб используют резиновые пробки с трубками для подачи углекислого газа. Трубку опускают до дна сосуда. В резиновой пробке делают широкое коническое отверстие, которое обеспечивает удаление углекислого газа, используемого для насыщения среды во время взятия проб и позволяет вводить пипетки в колбу. Бурное насыщение газом вместе с энергичным перемешиванием дает возможность отбирать однородные пробы.

При использовании в качестве субстратов слаборастворимых веществ (например кормов) некоторые исследователи для каждого периода ферментации рекомендуют использовать отдельные сосуды, что значительно уменьшает ошибки, связанные с отбором проб. При изучении переваримости растворимых углеводов возможность ошибок при взятии образцов для анализа значительно уменьшается, однако следует иметь в виду, что при ферментации крахмала иногда образуется гель, что затрудняет получение гомогенных образцов.

Аппаратура для непрерывной ферментации здесь нами не описывается, так как сведения о параметрах каждой системы содержатся в ее технической документации. С особенностями проведения экспериментов в непрерывных системах можно ознакомиться по цитированной литературе.

2.3.4. Создание анаэробиоза и перемешивание инкубационной среды

Анаэробные условия для культивирования in vitro ассоциаций рубцовых микроорганизмов чаще всего создают за счет использования углекислого газа. Существуют две основных системы подачи углекислого газа в ферментационные сосуды: непрерывная и одномоментная.

При использовании непрерывной системы подачу углекислого газа осуществляют по трубке, выходное отверстие которой располагается у дна колбы. Пузырьки газа проходят через всю толщу среды и вытесняют остаточные количества кислорода воздуха из пространства над средой. Подачу углекислоты в каждый сосуд проводят по отдельным трубкам из общего коллектора, а ее избыток, возникающий при непрерывном насыщении, отводят с помощью поставленного в резиновой пробке дефлегматора или клапана Бунзена. Последний очень прост по конструкции и легко может быть изготовлен в каждой лаборатории. Для этого герметично закрытый с одного конца отрезок резиновой трубки с продольным разрезом по ее оси надевают на выступающий над пробкой конец выводной стеклянной трубки и клапан Бунзена готов. Щелевидный разрез на резиновой трубке обеспечивает удаление избыточного газа и предотвращает поступление воздуха в сосуд. При использовании дефлегматора его заполняют дистиллированной водой или 20%-ным раствором пирогаллола, изготовленным на 40%-ном растворе КОН. Для непрерывного насыщения среды используют также последовательное соединение с помощью резиновых трубок нескольких колб, последнюю из которых снабжают устройством для стравливания избыточного газа.

Одномоментная система предусматривает однократное насыщение среды углекислотой вместе с внесенным в нее посевным материалом. После насыщения колбы герметически закрывают резиновыми пробками с установленными в них клапанами Бунзена или дефлегматорами и ставят на инкубацию. Дальнейшее поддержание анаэробных условий в среде обеспечивается углекислотой, образующейся в результате интенсивной жизнедеятельности микроорганизмов, но только в том случае, если поступление воздуха в сосуд исключено. Однако при почасовых исследованиях, в связи с неоднократным отбором проб, возникает необходимость в дополнительном насыщении ферментационной среды углекислым газом.

Перемешивание инкубационной среды в процессе ферментации не является обязательным элементом техники проведения экспериментов in vitro , так как многими исследователями было показано, что и без него, даже при работе с нерастворимыми субстратами, ферментативные процессы не нарушаются. Однако перемешивание применяется для приготовления однородного посевного материала и при отборе проб для анализа.

2.3.5. Температура и продолжительность инкубации

Рубцовые бактерии очень чувствительны к высоким температурам, и поэтому следует внимательно следить за тем, чтобы температура в течение всего времени инкубации поддерживалась не выше 40^0С. Продолжительное воздействие высокой температуры на рубцовые микроорганизмы приводит к снижению их активности. При проведении исследований in vitro оптимальной является температура 39^0С. Поддержание такой температуры лучше всего достигается в водяных банях ультратермостатов, но могут быть использованы и термостаты с надежной системой регулирования температуры, так как отклонение в температурном режиме более чем на $0,5^0$С может приводить к нарушению ферментативных процессов.

Продолжительность проведения опытов in vitro целиком зависит от природы сбраживаемых субстратов и колеблется от нескольких часов до нескольких суток. Простые сахара начинают сбраживаться уже через несколько минут после внесения в среду посевного материала и пик их ферментации наблюдается через 1 - 2 ч. Крахмал ферментируется медленнее и, как правило, спустя сутки после начала инкубации в среде остается небольшое его количество. Поэтому при работе с легкоферментируемыми углеводами бывает трудно обеспечить максимальный уровень ферментации в течение длительного времени, так как они становятся лимитирующими. Это обстоятельство и является определяющим при установлении продолжительности опытов.

Переваривание клетчатки начинается в более поздние сроки и происходит с меньшей интенсивностью, нежели легкорастворимых углеводов. Переваривание нативной клетчатки грубых кормов наблюдается уже через 6 ч после начала инкубации, тогда как сбраживание очищенной целлюлозы начинается только спустя 12 - l4 ч. Лищеко (1) показал, что в случае использования в качестве источника целлюлозы обеззоленных фильтров в первые сутки инкубации наиболее интенсивное расщепление целлюлозы наблюдается спустя 20 - 24 ч. Довольно активное переваривание целлюлозы сохраняется и в течение вторых суток инкубации. Дальнейшее инкубирование до 72 - 96 ч сопровождается резким снижением pH до 5 - 5,3 и угнетением целлюлозолитической микрофлоры. Смирнов (2) обнаружил, что хорошим источником клетчатки для проведения опытов in vitro может быть обработанный вымачиванием целлофан, но продолжительность инкубации при этом увеличивают до 3 суток. Таким образом, при проведении исследований по изучению переваримости клетчатки продолжительность инкубации определяется в основном источником целлюлозы.

2.3.6. Регулирование pH и прекращение ферментации

Известно, что максимальная ферментативная и синтетическая активность рубцовой микрофлоры обеспечивается при pH в пределах 6,7 - 7,0. Для переваривания клетчатки оптимум pH составляет около 6,9, а

при переваривании крахмала - 6,8. В связи с тем, что в замкнутых системах удаления конечных продуктов метаболизма не происходит, образующиеся в процессе сбраживания углеводов органические кислоты могут значительно снизить pH среды и, таким образом, ухудшить условия для ферментации. Поэтому регулирование pH в процессе ферментации часто бывает необходимым.

При переваривании клетчатки интенсивность образования кислот сравнительно невелика и обычно бывает достаточно отрегулировать pH 2 - 3 раза в сутки. Крахмал и простые углеводы сбраживаются значительно быстрее. Так, например, Мур с соавт. (27) обнаружили, что при сбраживании крахмала pH среды в первые 12 ч инкубации заметно не изменяется. В последующие часы pH очень быстро снижается и для поддержания максимальной активности крахмалгидролизующих микроорганизмов необходимо повысить буферность среды или ежечасно регулировать pH среды до 6,8. При ферментации глюкозы изменение pH может быть более резким и наблюдаться уже через час после посева.

При использовании в качестве источника азота мочевины за счет ее гидролиза и образования аммиака при медленном образовании органических кислот pH среды может подняться выше 7. Это обычно кратковременное явление, но оно может оказаться губительным для бактерий рубца, поскольку они более чувствительны к повышению, чем к понижению уровня pH.

Регулирование pH среды проводят различными кислотными и щелочными растворами, но чаще всего для этой цели используют насыщенный раствор карбоната натрия и раствор фосфорной кислоты.

Для остановки ферментации может быть использовано любое средство, подавляющее жизнедеятельность микроорганизмов. Для этих целей с успехом применяют просто охлаждение ферментационной среды и ее замораживание, добавление спиртов, кислот, хлорида ртути и других антисептиков. Однако следует помнить, что выбор вещества для прекращения ферментации нужно проводить с учетом задач эксперимента. Например, при определении биосинтеза микробного белка широко используют его осадители, такие как трихлоруксусная кислота или вольфрамат натрия. Их использование при изучении углеводного обмена нежелательно, так как трихлоруксусная кислота затрудняет идентификацию образующихся при ферментации летучих жирных кислот, а при применении вольфрамата натрия становится невозможным определение углеводов антроновым методом из-за интенсивного синего окрашивания культуральной жидкости после добавления антрона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лищенко В.Ф. Переваривание клетчатки в рубце при разном уровне легкоферментируемых углеводов в рационе. Автореф. канд. дисс..., Боровск, 1966.

2. Смирнов А.И. Сравнительная оценка различных источников клетчатки для определения целлюлозолитической активности микро-

флоры желудочно-кишечного тракта у жвачных животных. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. жив., Боровск, 1969, 5 (13): 74-77.

3. Adler J.H., Dye J.A., Boggs D.E., Williams H.H. Growth of rumen microorganisms in an in vitro continuous-flow system of a tein free diet. Cornell. Vet., 1958,48: 53.

4. Bentley O.G., Johnson R.R., Vanecko S., Hunt C.H. Studies on factors needed by rumen microorganisms for cellulose digestion in vitro. J. Anim. Sci., 1954, 13, 3: 581-593.

5. Bentley O.G., Lehmkuhl A., Johnson R.R., et al. The cellulolytic factor activity of certain short-chained fatty acids. J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76: 5000.

6. Bentley O.G., Johnson R.R.,Hershberger T.V. et al. Cellulolytic factor activity of certain short-chain fatty acids for rumen microorganisms in vitro. J. Nutr., 1955, 57, 3: 389-398.

7. Bowie W.G. In vitro studies of rumen microorganisms using a continuous flow system. Amer. J. Vet. Res., 1962, 23: 858.

8. Bryant M.P., Doetcsh R.N. Factors necessary for the growth of Bacteroides succinogenes in the volatile acid fraction of the rumen fluid. J.Dairy Sci., 1955, 38: 340-350.

9. Burroughs W., Franks N.A., Gerlaugh P., Bethke R.M. Preliminary observations upon factors influencing cellulose digestion by rumen microorganisms. J. Nutr., 1950, 40: 9.

10. Burroughs W., Headley H.G., Bethke R.M., Gerlaugh P. Cellulose digestion in good and poor quality roughages using an artificial rumen. J. Animal. Sci., 1950, 9: 513.

11. Cheng E.W., Hall G., Burroughs W. Method for study cellulose digestion by washed suspensions of rumen microorganisms. J. Dairy Sci., 1955, 38, 11: 1225-1230.

12. Dehority B.A. Bentley O.G., Johnson R.R., Moxon A.L. Isolation and identification of compounds from autolyzed yeast, alfalfa meal and casein hydrolysate with cellulolytic factor activity for rumen microorganisms in vitro. J. Anim. Sci., 1957, 16: 502-514.

13. Dehority B.A., El-Shazly K., Johnson R.R. Studies with the cellulolytic fraction of rumen bacteria obtained by differential centrifugation. J. Anim. Sci., 1960, 19, 4: 1098-1109.

14. El-Shazly K., Dehority B.A., Johnson R.R. Effect of starch on the digestion of cellulose in vitro and in vivo by rumen microorganisms. J. Anim. Sci., 1961, 20: 268.

15. El-Shazly K., Johnson R.R., Dehority B.A., Moxon A.L. Biochemical and microscopic comparison of in vivo and in vitro fermentation. J. Anim. Sci., 1961, 20: 839.

16. Ewart J.M. Continuous in vitro rumen systems. Proc. Nutr. Soc. 1974, 33, 2: 125-133.

17. Gil L.A., Shirley R.L., Moore J.E. Effect of methionine hydroxy analogy on bacterial protein synthesis from urea glucose, starch or cellulose by rumen microbes in vitro. J. Anim. Sci. 1973, 31, I: 159-163.

18. Gray F.V., Weller R.A., Pilgrim A.F., Jones G.B. A stringent test for the artificial rumen. Austr. J. Agr. Res., 1962, 13: 343.

19. Harbers L.H., Tillman A.D. Continuous liquid culture of rumen microorganisms. J. Anim. Sci., 1962, 21: 575.

20. Hershberger T.V., Bentley O.G., Moxon A.L. A rapid volumetric method for the determination of cellulose in studies with rumen microorganisms in vitro. J. Anim. Sci., 1955, 14, 3: 725-730.

21. Hobson P.N., Smith W. Continuous culture of rumen bacteria. Nature, 1963, 100: 607.

22. Hoover W.H., Grooker B.A., Sniffen C.J. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers incontinuous cultures of rumen contents. J. Anim. Sci., 1976, 43, 2: 528-534.

23. Hoover W.N., Knowlton P.H., Stern M.D., Sniffen G.J. Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous cultures of rumen contents. J. Anim. Sci., 1976, 43, 2: 535-542.

24. Maeng W.J. Van Nevel C.J., Baldwin R.L., Morris J.G. Rumen microbiol growth rates and yields: effect of amino acids and protein J. Dairy Sci., 1976, 59, 1: 68-79.

25. Mc Doudall E.I. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J., 1948, 43, 1: 99-109.

26. Mc Naught M.L. The utilization of non-protein nitrogen in the bovine rumen. 7. A qualitative and quantitative study of the breakdown of carbohydrate which accompanies protein in bovine rumen contents during in vitro incubation. Biochem. J. 1951, 49: 325.

27. Moore J. E. Jonhson R.R., Dehority B.A. Adaptation of an in vitro system to the study of starch fermentation by rumen bacteria. J. Nutr., 1962, v.76, p.414.

28. Jonhson R.R., Dehority B.A., Bentley O.G. Studies on the in vitro rumen procedure. Improved inoculum preparation and the effects of volatile fatty acids on cellulose digestion. J. Anim. Sci., 1958, 17, 3: 841-850.

29. Johnson R.R. Symposium on microbial digestion on ruminants: In vitro rumen fermentation techniques. J. Anim. Sci., 1963, 22: 792.

30. Johnson R.R. Techniques and procedures for in vitro and in vivo rumen studies. J. Anim. Sci., 1966, 25, 3: 855-875.

31. Quinn L.Y. Continuous culture of ruminal microorganisms in chemically defined medium. I. Design of continuous culture apparatus. Appl. Microbiol., 1962, 10, 6: 580-582.

32. Quinn L.Y.,Burroughs W., Christiansensen W.C. Continuous culture of rumen microorganisms in chemically defined medium. II. Culture medium studies. Appl. Microbiol., 1962, 10, 6: 583-592.

33. Rufener W.H., Nelson W.O., Wolin M.J. Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. Appl. Microbiol., 1963, 11, 3: 196-201.

34. Slyter L.L., Nelson W.O., Wolin M.J. Modification of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. Appl. Microbiol., 1964, 12: 374.

35. Stewart D.G., Warner R.G., Seleey W.W. Continuous culture as a method for studying rumen fermentation. Appl. Microbiol., 1961, 9, 2: 150-156.

36. Vatthauer R.J., Hinds F.C., Garrigus U.S. Continuous in vitro culture system for ruminant research. I. Design.II. Biological characterization J. Anim. Sci., 1970, 30, 4: 618-633.

37. Warner A.C.I. Criteria for establishing the validity of in vitro studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen system. J. Gen. Microbiol., 1956, 14: 733.

3. ПРОСТЕЙШИЕ РУБЦА И МЕТОДЫ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

Большая часть питательных веществ рациона жвачных животных подвергается в преджелудках сложным превращениям. Значительная роль в этих процессах принадлежит простейшим. Инфузории рубца являются симбионтами макроорганизма, их численность варьирует в пределах от 10^4 до 10^6 в 1 мл рубцовой жидкости.

3.1. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТЕЙШИХ

Одноклеточные животные, населяющие преджелудки жвачных и составляющие их микрофауну, относятся к типу простейших (protozoa, от греч. protos - первый и zoon - животное). Это микроскопические организмы, продолговато-овальной или овальной формы, в большинстве своем имеющие реснички (мембранеллы) и поэтому относящиеся к классу инфузорий. Величина их варьирует от 20 до 200 мкм

Первые данные об инфузориях, обитающих в преджелудках жвачных, были получены французскими учеными Груби и Делафондом в 1843 году, затем Колином были выполнены рисунки простейших рубца, а первые работы по систематике и морфологии были проведены Штейном. До сих пор одним из лучших руководств по малоресничным инфузориям является монография Догеля (1), хотя позднее и были предложены другие классификации: Кофоида и Мак Леннена, Любинского и, наконец, Латтера. Подробно морфология инфузорий рубца жвачных описана Хангейтом (14).

Снаружи тело инфузорий покрыто трехслойной кутикулой. Под ней располагается слой мелкозернистой эктоплазмы. Остальная масса тела, по данным электронной микроскопии, представлена цитоплазмой с целым рядом органоидов: одним или несколькими ядрами (макронуклеусом и микронуклеусом), сократительными вакуолями, скелетными пластинками, митохондриями и т.д. Цитоплазматическая сеть богата рибосомами, в состав которых входит рибонуклеиновая кислота, принимающая участие в синтезе белков.

На переднем конце тела инфузории расположено ротовое отверстие (цитостом), оно окружено ресничками или адоральной зоной мембранелл. По данным Бретштейдера, каждая мембранелла состоит из 80 ресничек, расположенных в шесть рядов, а между рядами имеются микроворсинки. Адоральная зона мембранелл образует двойную спираль и только непосредственно у ротового отверстия - одинарную. Эти зоны ресничек являются сокращающимися и служат для передвижения и заглатывания пищи. Ротовое отверстие ведет в глотку.

Центральная часть цитоплазмы - эндоплазма, представляет собой пищеварительную полость, которая в задней части тела сообщается с цитопроктом, через который у простейших выделяются продукты метаболизма.

Задний конец тела инфузорий может быть гладким, закругленным или же вооруженным простыми или разветвляющимися шипами и лопастями. Эти образования, их количество и форма имеют значение при определении вида простейших.

Форма макронуклеуса у инфузорий разнообразна, но для каждого вида типична и постоянна. Располагается макронуклеус между глоткой и дорзальной стороной тела инфузории. Он окружен ядерной мембраной, состоящей из двух листков - наружного, являющегося продолжением эндоплазматической сети, и внутреннего, образованного веществом ядра. Пространство между этими листками, переходящее в цистерны эндоплазматической сети, образует перинуклеарное или вокругядерное пространство.

Микронуклеус небольшой, обычно округлой формы. В цитоплазме инфузорий некоторых видов имеются скелетные пластинки, образованные тесно прилегающими друг к другу многогранными призмочками. Количество скелетных пластинок может колебаться от одной до пяти. Они состоят из вещества, близкого по составу к клетчатке.

Выделительная система представлена сократительными вакуолями. Их количество у инфузорий иногда достигает пятнадцати.

В рубце жвачных животных обычно встречаются две большие группы инфузорий - голотрихи и энтодиниоморфы (олиготрихи по старой классификации).

Голотрихи (Holotricha) - равноресничные, вся поверхность их тела покрыта не соединяющимися друг с другом ресничками. Обитающие в преджелудках инфузории семейства Isotrichidae включают в себя роды Isotricha и Dasytricha и входят в порядок Trichostomatida подкласса Holotricha.

Энтодиниоморфы (олиготрихи) - малоресничные инфузории. Ресничные образуют вокруг ротового отверстия спиральные ленты (синцилии). В пищеварительном тракте жвачных обитают главным образом инфузории семейства Ophryoscolecidae, которое входит в порядок Entodiniomorpha подкласса Spirotrichia.

3.1.1. Голотрихи рубца

Голотрихи в рубце жвачных представлены родами Isotricha, Dasytricha и Butschlia. В рубце чаще встречаются два вида изотрих - Isotricha intestinalis и Isotricha prostoma. Они несколько различаются по форме. I. intestinslis имеет размеры 97 - 131×68 - 87 мкм, а I. prostoma - 80 - 160×53 - 100 мкм. В теле этих простейших имеется кариофор - плазматические стебельки, поддерживающие макронуклеус.

Из рода Dasytricha обычно встречается только один вид - D. ruminantium. Инфузории этого вида мельче и обнаруживаются в рубце в большем количестве.

Инфузории из рода Butschlia находят не всегда и их количество не превышает 1 - 2% от общей численности популяции простейших в рубце.

По сравнению с малоресничными голотрихи двигаются в рубцовой жидкости более быстро. Из-за крупных размеров изотрихи хорошо видны под микроскопом в свежем рубцовом содержимом. Они остаются жизнеспособными более длительное время в присутствии кислорода воздуха в условиях in vitro.

Голотрихи легко ассимилируют углеводы и как запасной материал откладывают их в виде амилопектина (14), который при окрашивании йодом придает клеткам инфузорий темный цвет.

3.1.2. Энтодиниоморфы рубца

Поскольку в пищеварительном тракте жвачных животных обитают инфузории, главным образом принадлежащие к семейству Ophryoscolecidae, мы приведем основные их морфологические данные и классификацию по Догелю (1).

Таксономически в семействе различают семь родов: Entodinium, Diplodinium, Epidinium, Ophryoscolex, Opisthotrichum, Cunhaia, Caloscolex. У европейских домашних животных с многокамерным желудком обнаружены только первые четыре рода.

3.1.2.1. Род Entodinium (Штейн, 1858)

Этот род является самым значительным из всех родов и включает в себя многочисленные виды. Все они имеют небольшие размеры до 120 мкм в длину и до 30 мкм в ширину. Основные отличительные признаки их следующие:

- ресничный аппарат состоит только из одной, а именно, адоральной зоны мембранелл, окаймляющей передний край тела;
- большое ядро всегда имеет простую форму, а малое ядро располагается слева от него;
- есть только одна сократительная вакуоль, которая лежит в передней части тела;
- нет внутреннего скелета.

3.1.2.2. Род Diplodinium (Шуберг, 1888)

Этот род характеризуется следующими главными чертами строения:

- ресничный аппарат состоит из двух зон мембранелл. Обе зоны находятся на переднем конце тела и разделены апикальным (теменным) отростком;
- большое ядро может утрачивать свою простую колбасовидную форму, загибаясь в виде крючка или образуя на себе глубокие вырезки. Микронуклеус лежит у всех видов дорсально от макронуклеуса;
- имеются две сократительные вакуоли в продольном положении;
- тело более или менее сплющено с боков, скелет обнаруживается не всегда.

Род Diplodinium подразделяется на 4 подрода.

Представителей подрода Anoplodinium характеризует наличие двух вакуолей и только одна очень расширенная скелетная пластинка, которая достигает заднего конца тела, тогда как у Eudiplodinium и Polyplastron пластинки доходят лишь до макронуклеуса. Глотка у Ostracodinium тянется от рта назад почти по прямой линии; у предыдущих подродов она отгибается в дорсальном направлении. Кроме того, глотка Ostracodinium сократительных вакуолей, отсутствие скелетной пластинки, длина тела 70 мкм, ширина 55 мкм. Этот подрод включает в себя 18 видов.

Инфузории подрода Eudiplodinium имеют две сократительные вакуоли, 1 - 2 скелетные пластинки, длина их достигает 100 - 105 мкм, ширина 60 - 100 мкм. К данному подроду относятся 13 видов. У диплодиний, относящихся к подроду Polyplastron, число сократительных вакуолей повышается до 3 - 4 и даже 9, причем вакуоли могут образовывать не только спинной продольный ряд, но и находиться в других местах тела. Скелетных пластинок 4 - 5, длина тела 160 мкм, ширина 95 мкм. К этому подроду принадлежит всего один вид P.multivesiculatum синоним Diplodinium multivesiculatum.

У представителей подрода Ostracodinium имеются 2 - 6 сократительных резко дифференцирована на узкий начальный отдел и на очень широкий главный. В данный подрод входит 8 видов.

Большинство видов подрода Ostracodinium не вооружено, но некоторые виды имеют 1 - 3 хвостовых шипа или лопасти, длина тела 110 мкм, ширина 50 мкм.

3.1.2.3. Род Epidinium (Краулей,1923)

Ресничный аппарат состоит из двух зон мембранелл. Обе находятся на переднем конце тела, но дорсальная лежит позади адоральной;

- большое ядро имеет простую булавовидную или колбасовидную форму и не образует характерных для многих Diplodinium выростов и выемок;
- выделительный аппарат состоит всегда из двух вакуолей, расположенных продольно;
- скелет состоит из трех продольных пластинок: правосторонней, брюшной и левосторонней. Размеры тела: длина 130 мкм, ширина 50 мкм;
- вооруженные виды Epidinium обладают всегда простыми, а не разветвленными, как у Ophryoscolex, шипами.

Этот род занимает промежуточное положение между родами Diplodinium и Ophryoscolex. Он отличается от Diplodinium положением своего ресничного аппарата и формой скелета. От Ophryoscolex он отличается числом вакуолей, а также расположением и видом отростков.

3.1.2.4. Род Ophryoscolex (Штейн, 1858)

Представители этого рода достигают в длину 150 мкм, в ширину - 80 мкм.

Ресничный аппарат состоит из двух зон мембранелл, между которыми находится презональный отдел тела в виде усеченного конуса. Дорсальная зона мембранелл охватывает 4/5 всей периферии тела;

- макронуклеус имеет простую колбасовидную форму;
- сократительные вакуоли многочисленны (9 - 15), причем всегда располагаются в виде двух венчиков, переднего и заднего;
- скелет почти такой же, как у Epidinium, и состоит из трех пластинок.

Виды этого рода обычно имеют много шипов, причем последние образуют на заднем конце тела от 2 до 4 венчиков. В переднем из венчиков шипы всегда вилообразно расщеплены на 2 - 6 ветвей. Подобных шипов не имеет ни один из других родов этого семейства.

Вышеприведенные признаки достаточны для определения родовой принадлежности преобладающих инфузорий рубца, но для идентификации видов или сравнительно редко встречающихся родов целесообразно пользоваться монографией Догеля (1).

3.2. МЕТОДЫ ФИКСАЦИИ И ОКРАШИВАНИЯ ПРОСТЕЙШИХ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В зависимости от целей экспериментов используют различные методы фиксации и окрашивания простейших.

3.2.1. Фиксация формалином

Этот метод используют при подсчете общего количества простейших в содержимом рубца. Сразу после взятия его фильтруют через два слоя марли и консервируют 4%-ным водным раствором формалина в соотношении 1:1. В пробирку вносят 5 мл формалина, добавляют 5 мл рубцовой жидкости и закрывают резиновой пробкой. Законсервированные этим способом пробы можно сохранять длительное время.

3.2.2. Формалинизированный солевой раствор метилового зеленого

Этот раствор обеспечивает надежную фиксацию, окрашивание ядра и хранение инфузорий и используется при их идентификации. Он имеет темно-зеленый цвет и состоит из следующих компонентов: метиловый зеленый - 0,6 г; NaCl - 8,0 г; 35%-ный раствор формальдегида - 100 мл; дистиллированная вода - 900 мл. Раствор сохраняют плотно укупоренным в темном месте длительное время. Если его сохранять на свету, метиловый зеленый разлагается до метилвиолета и становится непригодным для окрашивания.

На один объем образца добавляют 5 - 10 объемов раствора метилового зеленого, окрашивают 30 мин и готовят препараты для микроскопии. При этом окрашиваются только ядра простейших.

Образцы, фиксированные формалинизированным солевым раствором метилового зеленого и сохраняемые в темноте, остаются пригодными для исследований, по меньшей мере, до трех лет.

3.2.3. Формалинизированный солевой раствор трипанового синего

Этот раствор используют для дифференциации живых и мертвых клеток инфузорий рубца. Он имеет темно-синий цвет и состоит из следующих компонентов: трипановый синий - 2 г, NaCl - 8 г, 35%- ный раствор формальдегида - 100 мл, дистиллированная вода - 900 мл. Раствор может храниться длительное время.

Когда образцы простейших добавляют к 5 - 10-кратному объему раствора трипанового синего, макронуклеус живых организмов окрашивается в светло-синий цвет, а другие части тела не окрашиваются или окрашиваются в очень светло-синий цвет, тогда как целые тела мертвых организмов окрашиваются в темно-синий цвет. Окрашенные трипановым синим препараты должны просматриваться быстро в пределах двух дней после фиксации.

3.2.4. Железо-гематоксилиновое окрашивание по Гейденгайну (Heidenhein′s)

Этот метод окрашивания пригоден для детальных морфологических исследований, особенно ядер. Препараты, приготовленные по этому методу, позволяют наблюдать цитологические детали с наибольшей ясностью и сохраняются долгие годы без ухудшения их качества.

Процедура окрашивания по Огимото и Имаи (18) состоит из следующих этапов:

1. Фиксируют образцы в фиксаторе Шаудина (Schaudinn′s). Он имеет следующий состав: насыщенный водный раствор $HgCl_2$ - 66 объемов, абсолютный этанол - 33 объема, ледяная уксусная кислота - 1 объем. Перед использованием эти реагенты смешивают и фиксатор применяют горячим ($+50^0C$) или холодным. Продолжительность фиксации 10 - 30 мин. Поскольку фиксатор Шаудина содержит ртуть, исследователь должен быть осторожным при его применении.

При работе с препаратами простейших, приготовленными на предметном стекле, бывает трудно выполнить все необходимые операции без потерь клеток инфузорий и ухудшения качества препаратов. Поэтому предложено суспензию инфузорий вносить в центрифужную пробирку с предварительно налитым в нее фиксатором. По завершении фиксации образцы центрифугируют при 150 g - 3 мин, супернатант удаляют и к осадку добавляют новый реагент. Эту операцию повторяют когда реагент необходимо будет заменить. Рекомендуемая процедура с применением центрифужных пробирок может быть использована и в других методах окрашивания, таких как окрашивание гематоксилин-эозином, пиронин-метиловым зеленым, а также в реакциях Фельгена и Шика.

2. Удаляют кристаллы $HgCl_2$, которые могут образовываться, и переносят образцы в 70%-ный этанол, приготовленный на йодном растворе Люголя до цвета темного виски, на 20 мин.

3. Отмывают в 70%-ном этаноле три раза по 15 мин каждый.

4. Погружают в 50%-ный этанол на 15 мин.

5. Погружают в дистиллированную воду два раза по 15 мин каждый.

6. Оставляют стоять в 4%-ном водном растворе железных квасцов от 4 ч до одной ночи.

Для приготовления раствора используют железные квасцы хорошего качества со светлыми фиолетово-окрашенными кристаллами. Раствор готовят каждый раз свежий.

7. Отмывают 2 мин в дистиллированной воде.

8. Окрашивают в 0,5%-ном растворе гематоксилина от 4 до 12 ч.

Раствор гематоксилина готовят следующим образом: растворяют 0,5 г гематоксилина в 5 мл абсолютного этанола и затем доводят объем раствора дистиллированной водой до 100 мл. Раствор оставляют стоять при комнатной температуре от нескольких дней до одной недели, используют раствор когда он становится прозрачным темно-красного цвета, а применять его можно около трех месяцев.

9. Отмывают 2 мин в дистиллированной воде.

10. Дифференцируют в 2%-ном водном растворе железных квасцов. Проверка хода дифференциации осуществляется под малым увеличением микроскопа.

11. Отмывают дистиллированной водой в течение 1,5 ч. Для рубцовых простейших воду в центрифужной пробирке меняют каждые 5 мин.

12. Обезвоживают в серии этанола по 15 мин в каждой.

13. Просветляют в ксилоле два раза по 15 мин каждый.

14. Наносят простейшие на предметное стекло и заключают их в нейтральную смолу (канадский бальзам, даммаровая смола и др.).

3.2.5. Импрегнация инфузорий серебром (18)

Импрегнация серебром широко используется при изучении простейших и особенно при демонстрации распределения кинетосом. Процедура протарголового метода по Бодиану (Bodian′s) состоит из следующих этапов.

1. Приготовление краски.

Используют протаргол хорошего качества. Готовят 1%-ный раствор путем посыпания протаргола на поверхность дистиллированной воды в мензурке без нагревания, размешивания или других манипуляций. Раствор готовят свежим для каждого применения и используют в присутствии меди. С этой целью кусочки медной проволоки массой 0,5 г добавляют в протарголовый раствор из расчета 5 г на каждые 100 мл раствора.

2. Фиксируют инфузории в фиксаторах Холланда (Holland′s) или Боуэна (Bouin′s).

Фиксатор Холланда имеет следующий состав: ацетат меди, нейтральный - 2,5 г; пикриновая кислота - 4 г; 35%-ный раствор формальдегида - 10 мл, ледяная уксусная кислота - 1,5 г; дистиллированная вода - 100 мл. Растворяют ацетат меди в холодной воде в ступке, добавляют маленькими порциями пикриновую кислоту и полученную смесь сохра-

няют. Формальдегид и уксусную кислоту добавляют перед использованием.

Фиксатор Боуэна имеет следующий состав: насыщенный водный раствор пикриновой кислоты - 75 мл, 35%-ный раствор формальдегида - 25 мл, ледяная уксусная кислота - 5 мл. Эти реагенты смешивают перед использованием.

3. Помещают необходимое количество медной проволоки в чашку (тарелку) и наливают раствор протаргола.

4. Выдерживают образцы в растворе протаргола с медной проволокой от 2 до 3 дней при температуре 37^0С. Раствор меняют на второй день.

5. Отмывают в дистиллированной воде.

6. Восстанавливают в 1%-ном гидрогуиноне, приготовленном на 5%-ном растворе сульфата натрия, 5 - 10 мин.

7. Отмывают в нескольких сменах дистиллированной воды.

8. Тонируют в 1%-ном хлориде золота 4 - 5 мин.

9. Отмывают дистиллированной водой.

10. Помещают в 2%-ый раствор щавелевой кислоты и выдерживают в нем до появления пурпурного (темно-красного) окрашивания обычно около 3 мин.

11. Отмывают дистиллированной водой.

12. Помещают в 5%-ный раствор тиосульфата натрия на 5 - 10 мин.

13. Отмывают несколько раз дистиллированной водой.

14. Обезвоживают, просветляют в ксилоле и заключают в нейтральную смолу.

3.2.6. Витальные методы окрашивания

Для витального окрашивания пользуются одним из следующих методов:

1. Приготовляют раздавленную каплю из жидкости с простейшими. Возле края покровного стекла, из-под которого выступает жидкость, пипеткой наносят каплю раствора краски, а с другой стороны к покровному стеклу подводят полоски фильтровальной бумаги, создавая этим условия для поступления краски под стекло и ее тока в сторону фильтровальной бумаги.

2. На предметном стекле смешивают небольшую каплю жидкости с простейшими с такой же каплей красящего раствора и накрывают покровным стеклом.

3. На заранее высушенную на предметном стекле каплю концентрированного раствора краски наносят каплю взвеси с простейшими и накрывают покровным стеклом.

Приготовленные препараты исследуют под микроскопом. При необходимости просмотра препаратов под иммерсионной системой следует пользоваться тонкими предметными и покровными стеклами.

Для прижизненной окраски простейших используют следующие основные краски:

а) Нейтральрот. Применяют водные растворы в разведениях 1:1000 - 100000. Кислые элементы клеток окрашиваются в вишнево-красный цвет, щелочные - в желто-красный, нейтральные жиры - в красный. Хорошо воспринимают окраску ядра.

б) Метиленовая синька. Пользуются только химически чистой метиленовой синькой в разведении 1:500 - 1:10000. Щелочные растворы метиленовой синьки довольно интенсивно окрашивают некоторые протоплазматические включения.

в) Бриллиант-крезилблау. Применяют в водном растворе в разведении 1:1000.

г). Везувин в разведении 1:20000 - 1:30000 употребляют для изучения пищевых вакуолей. Красит протоплазму в желтоватый, гранулы - в красно-коричневый цвет.

3.3. ПОДСЧЕТ ПРОСТЕЙШИХ

Подсчет простейших в содержимом рубца проводят обычно в счетной камере Горяева под микроскопом, используя для этого малое увеличение (окуляр 7×, объектив 10×).

Перед взятием формалинизированного содержимого для подсчета простейших пробирку, закрытую пробкой, осторожно встряхивают для равномерного распределения инфузорий по всему объему жидкости. Затем содержимое пробирки набирают в пастеровскую пипетку. Первые капли выливают касаясь кончиком пипетки к фильтровальной бумаге, а последующими заполняют камеру.

Камера должна быть предварительно подготовлена. На пластинке с сеткой плотно притирают покровное стекло до тех пор пока не появятся, так называемые, ньютоновы кольца. Необходимо использовать для этой цели лишь специальные, более толстые шлифованные покровные стекла, т.к. тонкие гистологические не имеют безукоризненно плоской поверхности и в результате глубина камеры может быть местами больше или меньше, что явится причиной грубой ошибки. Каплю из пипетки помещают к краю покровного стекла и она засасывается под стекло, заполняя соответствующую половину сетки.

Метод подсчета клеток инфузорий такой же, как используется при подсчете форменных элементов крови и описывается в руководстве по лабораторным работам (4). Обычно подсчитывают количество простейших в 200 больших квадратах, а затем полученное число делят на 2 и определяют численность инфузорий в 1 мм^3 рубцового содержимого по следующей формуле:

$X = а \cdot 4000 \cdot в/б$

где а - количество простейших в 100 больших квадратах; б - количество сосчитанных малых квадратов (в одном большом содержится 16 малых); в - разведение содержимого.

1 малый квадрат равен 1/4000 мм^3, а в одном мм^3 инфузорий будет в 4000 раз больше, поэтому и умножают на 4000. А так как необходимо узнать количество простейших в 1 мл рубцовой жидкости, то полученное

по вышеприведенной формуле число нужно умножить на 1000 (1 мл = 1 $см^3$ = 1000 $мм^3$).

3.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИЙ ИНФУЗОРИЙ ИЗ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

Для изучения морфологии, биохимической активности и химического состава необходимо выделить из содержимого рубца чистую фракцию простейших. Обычно для этого используют метод дифференциального центрифугирования, описанный Ченгом с соавторами (5). Имеется несколько модификаций этой методики, сущность которых заключается, главным образом, в использовании различных буферных смесей в процессе инкубации содержимого и разном режиме скоростного центрифугирования.

При использовании свежевзятого содержимого выделение простейших можно проводить следующим образом: отфильтрованную рубцовую жидкость смешивают в равных объемах с буфером Мейера и соавт. (17), заливают в делительные воронки и инкубируют в термостате при 39^0C в течение 4 ч.

Буфер готовят растворяя в 1 л дистиллированной воды 5,0 г - NaCl; 2,15 г - CH_3COONa; 0,35 г - KH_2PO_4; 1,00 г - K_2HPO_4 ; 0,12 г - $MgSO_4$; pH - 6,9 - 7,0.

Во время инкубации инфузории оседают на дно воронки, а частицы корма поднимаются наверх. Поэтому каждый час осевшие простейшие сливают. Далее этот осадок разводят в буфере и центрифугируют 10 мин при 500 оборотах в минуту, осадок промывают буфером 2 - 3 раза, микроскопируют и при получении клеток инфузорий, свободных от частиц корма, их используют для дальнейшей работы. При таком способе выделения простейшие остаются живыми и могут быть применены для изучения их метаболической активности.

Но так как в процессе инкубации рубцовой жидкости жизнедеятельность микробных клеток продолжается, то нельзя быть уверенными, что качественный и количественный состав популяции останется без изменений. Поэтому для изучения химического состава фракций простейших применяется другой метод выделения биомассы инфузорий. При этом методе пробы рубцового содержимого сразу же после взятия консервируют в соотношении 1:1 10%-ным раствором формалина, к которому для лучшего отделения клеток от кормовых частиц добавляется 0,2%-ный раствор твина 80. Смесь выдерживают при комнатной температуре 48 ч и периодически ее тщательно встряхивают.

Для выделения биомассы простейших смесь фильтруют через 4 слоя марли и центрифугируют при 1000 оборотов 3 - 5 минут. Надосадочную жидкость используют далее для получения бактерий, а осадок промывают дистиллированной водой и повторно центрифугируют при таком же режиме. Отмывание проводят до тех пор пока микроскопически не подтвердится наличие чистых протозойных клеток.

Полученные препараты высушивают до постоянного веса при 65^0C. Зная сухой вес простейших, выделенных из определенного объема рубцовой жидкости, высчитывают количество протозойной массы, содержащееся в 100 мл содержимого рубца.

Следует однако отметить, что описанные выше методы довольно трудоемки и не гарантируют полной очистки от примесей.

Огимото и Имаи (18) рекомендуют метод выделения инфузорий с раствором сахарозы, который в значительной мере устраняет эти недостатки. Инфузории, полученные по этому методу, особенно пригодны для таксономических и морфологических исследований с использованием трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

Суть метода сводится к следующему. Содержимое рубца центрифугируют при 150 g в течение 5 мин и большую часть супернатанта удаляют. Осадок суспендируют в 10 мл супернатанта и добавляют к 40 мл 30%-ного (вес/объем) раствора сахарозы и центрифугируют при 150 g - 3 мин. Супернатант удаляют, а осадок инфузорий трижды отмывают 0,9%-ным (вес/объем) раствором хлористого натрия с помощью центрифугирования при 150 g в течение 5 мин каждый раз.

3.5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОСТЕЙШИХ

Многочисленные эксперименты, направленные на то, чтобы заставить простейших жить и размножаться в условиях in vitro до 1940 года не давали желаемых результатов, и только с работами Хангейта (12 - 14) такая возможность появилась. Основные принципы длительного сохранения инфузорий в активном состоянии в опытах in vitro позднее были изложены Колеманом (7 - 9), Кларком (6), Хино с сотр. (11) и др.

Для длительного культивирования простейших необходимо создать условия и воспроизвести питательную среду наиболее близкую к среде рубца.

Культуральные системы для простейших рубца подразделяются на два типа систем: периодическую (batch) и непрерывную. В первой культуры выращивают в колбах или бутылках с резиновыми пробками. Хотя этот метод относительно прост и не требует сложного оборудования, с его помощью можно поддерживать лишь около 10^4/мл клеток инфузорий, которые необходимо регулярно пересевать в свежую среду. В противоположность этому, непрерывная система может поддерживать около 10^5 - 10^6/мл клеток инфузорий, т.е. такие же уровни как и в рубце, но аппаратура и процедуры, используемые при непрерывном культивировании, много сложнее. Поэтому исследователи должны выбирать метод культивирования в соответствии с целью исследования.

3.5.1. Метод культивирования смешанной популяции простейших по Имаи с соавт. (15, 16)

Это один из наиболее простых методов культивирования инфузорий. Он позволяет поддерживать около 10^4 клеток смешанной популяции в 1 мл среды.

В качестве основы среды используют солевой раствор Хангейта, который имеет следующий состав (г/л): NaCl - 6; KH_2PO_4 - 1; $NaHCO_3$ - 1; $CaCl_2$ - 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_20$ - 0,05; дистиллированная вода - 1 л. Кальций и магний растворяют отдельно и добавляют в раствор перед использованием. В качестве питательных субстратов применяют люцерновую муку и рисовый крахмал, которые в виде 5%-ных (вес/объем) водных суспензий до внесения в среду сохраняют при 4^0C.

Приготовление среды и посев осуществляют следующим образом. К солевому раствору добавляют необходимые количества кальция и магния, по 0,5 мл суспензий люцерновой муки и рисового крахмала на каждые 100 мл среды, и 2 мин насыщают газовой смесью, состоящей из 5% CO_2 и 95% N_2. Затем вносят 2 мл рубцового инокулума, вновь насыщают газом в течение 1 мин, закрывают пробкой из бутиловой резины и инкубируют при 37 - 39^0C. Поддержание культуры осуществляют путем пересева половины объема содержащей инфузории культуры в свежую среду каждые 24 - 36 часов.

3.5.2. Культивирование отдельных видов энтодиниоморфных инфузорий по Колеману (10)

Для приготовления питательной среды используют основной концентрированный минеральный солевой раствор следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 12,7; KH_2PO_4 - 10,0; NaCl - 1,3; $CaCl_2$ (сухой) - 0,09; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,18; дистиллированная вода - 1 л. Из концентрированного раствора для различных видов инфузорий готовят растворы типа каудатум (caudatum-type) и типа симплекс (simplex-type). Раствор типа каудатум содержит: концентрированного раствора - 50 мл, дистиллированной воды - 50 мл, 15%-ного (вес/объем) раствора CH_3COONa - 0,5 мл и 2%-ного (вес/объем) нейтрализованного раствора L-цистеина солянокислого - 1 мл. Раствор типа симплекс включает: концентрированного раствора - 40 мл, дистиллированной воды- 60 мл, 5%-ного (вес/объем) раствора $NaHCO_3$ - 15 мл и 2%-ного (вес/объем) нейтрализованного раствора L -цистеина солянокислого - 1,1мл.

Обязательным компонентом питательных сред является рубцовая жидкость. Сразу после получения ее фильтруют через один слой марли, центрифугируют при 500 g 5 мин и используют супернатант. Свежую рубцовую жидкость сохраняют до двух недель при 4^0C. В среду добавляют 10% рубцовой жидкости.

В качестве питательных компонентов используют травяную муку, рисовый крахмал или непросеянную муку (с отрубями). Травяную муку готовят из высушенной на воздухе травы, которую размалывают до по-

лучения тонкого порошка. Он может продолжительное время сохраняться в темноте. Рисовый крахмал или непросеянную муку добавляют в среду в виде 1,5%-ной (вес/объем) водной суспензии. Для поддержания анаэробных условий используют газовую смесь, состоящую из 5% CO_2 и 95% N_2. Среду насыщают газом перед посевом и после него.

Для культивирования используют 50, 100 или 250 мл центрифужные пробирки (флаконы) почти полностью заполненные средой, а инкубацию ведут при 39^0C. Условия, необходимые для выделения и культивирования энтодиниоморф рубца, суммированы в таблице 3.5.2. Для поддержания жизнедеятельности инфузорий корм добавляют в указанных дозах в каждую пробирку ежедневно. Травяную муку вводят из расчета 1 мг на 10 мл среды.

3.5.3. Культивирование Dasytricha по Кларку и Хангейту (5)

Кларк и Хангейт (5) описали культивирование простейших вида Dasytricha ruminantium.

Культуральная среда состоит из 70 мл солевого раствора следующего состава: 0,15% K_2HPO_4; 0,60% NaCl; 0,001% $MgS0_4 \cdot 7H_20$ и 0,001% $CaCl_2$; 30 мл очищенной рубцовой жидкости; 0,5 г $NaHCO_3$; 0,02 г солянокислого цистеина; 0,1 мл 0,1%-ного резазурина и 3,0мл экстракта равноресничных простейших рубца.

Среду автоклавируют при 1 атм. 15 мин, затем охлаждают, насыщают свободным от кислорода CO_2 и закрывают резиновыми пробками для создания анаэробиоза. Среду можно не автоклавировать, а стерилизовать фильтрацией через мембранные фильтры и асептически разливать в культуральные пробирки.

Очищенную рубцовую жидкость готовят путем центрифугирования свежего рубцового содержимого при 20 000 g. Прозрачный супернатант хранят при -14^0C.

Суспензию рубцовых голотрих и энтодиниоморф получают из нескольких литров рубцового содержимого по методу Оксфорда (38), освобождают от растительных остатков и бактериальных клеток, затем замораживают, последовательно 3-х кратно погружая пробирки в смесь сухого льда и этилового спирта. Быстро оттаивают и разрушают в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Обломки инфузорий из суспензии отделяют центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин в рефрижераторной центрифуге. Надосадочную жидкость разводят в 2 - 3 раза буфером и используют в качестве протозойного экстракта.

Культивирование проводят в пробирках с зауженным горлышком размером 16×150 мм методом "roll tube". Пробирки имеют на дне небольшое выпячивание, около 13 мм. В каждую пробирку заливают по 10 мл среды и вносят около 500 клеток простейших, 80% их составляют голотрихи. Инкубируют при 38^0C в водяной бане, в темноте.

Примечания к таблице 3.5.2. а) НМ - непросеянная мука; РК - рисовый крахмал; цифры указывают оптимальные количества субстратов (мг/мл$^{-1}$), которые необходимо добавлять каждый день; круглые скобки показывают, что хотя простейшие будут расти ограниченное время на крахмале, он не является предпочитаемым субстратом;

б) + простейшие растут только на травяной муке, ++ травяная мука является предпочитаемым субстратом для роста; ? - не определено;

в) СРЖ - свежая рубцовая жидкость; АРЖ - автоклавированная рубцовая жидкость;

г) ХАФ - хлорамфеникол 48 мкг/мл$^{-1}$;

д) средние данные времени, в течение которого культуры оставались жизнеспособными и хорошо росли.

Очищенную рубцовую жидкость готовят путем центрифугирования свежего рубцового содержимого при 20 000 g. Прозрачный супернатант хранят при -14^{0}С.

Суспензию рубцовых голотрих и энтодиниоморф получают из нескольких литров рубцового содержимого по методу Оксфорда (38), освобождают от растительных остатков и бактериальных клеток, затем замораживают, последовательно 3-х кратно погружая пробирки в смесь сухого льда и этилового спирта. Быстро оттаивают и разрушают в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Обломки инфузорий из суспензии отделяют центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин в рефрижераторной центрифуге. Надосадочную жидкость разводят в 2 - 3 раза буфером и используют в качестве протозойного экстракта.

Культивирование проводят в пробирках с зауженным горлышком размером 16×150 мм методом "roll tube". Пробирки имеют на дне небольшое выпячивание, около 13 мм. В каждую пробирку заливают по 10 мл среды и вносят около 500 клеток простейших, 80% их составляют голотрихи. Инкубируют при 38^{0}С в водяной бане, в темноте.

Ежедневно к культуре простейших инъекцией добавляют по 5 мг сахарозы и 0,3 мл протозойного экстракта, разведенных в 0,8 мл анаэробного буфера. Обычно простейшие заселяют выпуклую часть пробирки, а растительные и клеточные осколки размещаются по основанию пробирки, поэтому через каждые 2 - 4 ч пробирки наклоняют под углом 25^0 на 15 мин, затем вновь ставят в вертикальное положение. Все манипуляции по приготовлению среды и переносу простейших проводят в атмосфере CO_2, свободной от O_2.

Авторы добавляли к культуральной среде различные ростовые вещества, но исключение из нее протозойного экстракта постепенно приводило к гибели инфузорий.

3.5.4. Культивирование других видов простейших

Необходимо отметить, что отдельные виды инфузорий требуют для своего развития различных условий питания.

Согден и Оксфорд (2) установили, что источником углеводного питания для Holotricha могут служить растворимые сахара, основной солевой средой для них был бикарбонатный буфер (pH 6,8 - 7,0), а потребность в азоте удовлетворялась добавлением к среде травяного сока. Введение в раствор галактозы и фруктозы продлевало жизнь простейших до 3-х дней, глюкозы - до 4 - 5 дней, а при добавлении рисового крахмала инфузории жили в культуре 8 дней.

Менее требовательны к условиям культивирования инфузории рода Diplodinium. Они могут расти в неорганическом буфере в присутствии порошка сена и крахмала или целлюлозы (12). В таких же условиях хорошо размножались простейшие рода Entodinium. В фосфатно-ацетатном буфере при наличии 0,05% порошка сена и 0,05% порошка ваты они жили 14 дней с частым делением до 8-го дня.

Гутиеррез (2) наблюдал увеличение числа Isotricha prostoma при культивировании в рубцовой жидкости (30%) и солевом растворе (70%) с добавкой сухой травы. Культура в таких условиях сохранялась более двух недель, причем простейшие делились через каждые 48 ч.

Очень требовательны к условиям существования и трудно культивируются инфузории рода Ophryoscolex. Помазной (3) удалось сохранить Ophryoscolex caudatus в активном состоянии в течение 10 дней. Культивирование проводили в фосфатно-уксусном буфере (pH 7,2 - 7,3) в анаэробных условиях при температуре 39^0C. Питательный субстрат (0,05 г картофельного крахмала и 0,05 г порошка листьев клевера) вносили в колбы с 75 мл буфера один раз в сутки. Порошок сена и крахмал перед этим предварительно стерилизовали при температуре 140^0C в течение 1 ч. Фосфатно-уксусный буфер заменяли через каждые 12 ч.

Часто при изучении роли простейших в переваривании отдельных питательных веществ корма, а также при выявлении образуемых в их клетках ферментов, необходимо получать культуры этих организмов свободные от бактерий. Для этой цели обычно используют антибиотики стрептомицин, неомицин, биомицин и др., которые добавляют в инкубируемую среду в концентраций 0,5 - 1,0 мкг/мл.

Следует однако заметить, что в связи широко распространенной множественной устойчивостью бактерий рубца к антибиотикам целесообразно перед постановкой опытов осуществлять подбор антибиотиков и их концентраций, обеспечивающих надежное ингибирование бактерий и существенно не изменяющих метаболическую активность инфузорий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Догель В.А. Простейшие Protozoa малоресничные инфузории. Л.: Изд-во АН СССР, 1929.

2. Курилов Н.В., Кроткова А.П. Физиология и биохимия пищеварения жвачных. М.: Колос, 1971.

3. Помазная М.Д. Культивирование и некоторые ферменты инфузорий, обитающих в рубце овец. Труды ВНИИФБиП с.-х. жив., 1966, 3: 174-178.

4. Предтеченский В.Е. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям. М.: Медгиз, 1960.

5. Cheng E. et al. J. Dairy Sci., 1963, 46, 2.

6. Clarke R.T., Hungate R.E. Culture of the rumen Holotrich Ciliate Dasytricha ruminantium Schuberg. Appl. Microbiol., 1966, 14, 3: 340- 345.

7. Coleman G.S. The cultivation of sheep rumen Oligotrich Protozoa in vitro. J.Gen.Microb., 1960, 22, 2: 555-563.

8. Coleman G.S. The gromth and metabolism of rumen ciliate protozoa. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 1963, 13: 298-324.

9. Coleman G.S. The cultivation of the rumen ciliate Entodinium simplex. J.Gen.Microbiol., 1969, 57: 81-90.

10. Coleman G.S. Rumen entodiniomorphid protozoa. ln.: Methods of cultivating parasites in vitro. Taylor E.R. a. Baker J.R., editors, Acad. Press, New York, 1978: 39-54.

11. Hino T., Kametaka M., Kandatsu M. The cultivation of rumen Oligotrich protozoa. J. gen. Appl. Microbiol., 1973, 19: 305-315.

12. Hungate R.E. Further experiments of cellulose digestion by Protozoa in the rumen of cattle. Biol. Bull, 1943, 84: 157-163.

13. Hungate R.E. ln.: Biochemistry and physiology of protozoa, Huther S. a. Lwoff A. eds., Acad. Press, New York, 1955, 2: 159-200.

14. Hungate R.E. The rumen and its microbes. Acad. Press, New York, London, 1966: 91-147.

15. lmai S., Katsuno M., Ogimoto K. Studies on conditions for a simple culture method of rumen ciliate protozoa in vitro. 1. Examination on the composition of salt solution, injected gas inoculated. Bull. Nippon Vet. Zootech.Coll., 1979, 28: 69-74.

16. lmai S., Katsuno M., Ogimoto K. Studies on conditions for a simple culture method of rumen ciliate protozoa in vitro. 2. Examination on additives and successive culture. Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll, 1979, 28: 75-83.

17. Meyer R.M. et al. Feed Processing. 1. Ration effects on rumen microbial synthesis and aminoacid composition. J. Dairy Sci., 1967, 50, 8: 1327-1332.

18. Ogimoto K., lmai S. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1981: 159.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ ПРЕДЖЕЛУДКОВ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

4.1. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1.1 Прямой микроскопический подсчет общего количества микроорганизмов

О росте микроорганизмов в естественных субстратах или на питательных средах судят по количеству микроорганизмов в единице объема. Выбор метода для определения числа микроорганизмов зависит от цели исследования, свойств питательной среды или субстрата, а также от особенностей роста и морфологии микроорганизмов. Количество клеток в единице объема можно определить непосредственным подсчетом их под микроскопом, либо путем учета роста микроорганизмов на питательных средах после высева определенного объема исследуемого материала.

Подсчитывать клетки микроорганизмов под микроскопом можно, используя счетные камеры, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах. Перечисленные методы позволяют определить общее количество микроорганизмов в единице объема.

Подсчет количества микроорганизмов в счетных камерах. Этот метод рекомендуется использовать для подсчета в нативном содержимом рубца относительно крупных бактерий (1). Сразу после взятия содержимое рубца фильтруют через два слоя марли, смешивают с равным объемом фиксирующей жидкости и выдерживают в течение суток при комнатной температуре, периодически встряхивая. Состав фиксирующего раствора: дистиллированная вода - 90 мл, формалин 40%-ный - 10 мл, твин 80 - 0,2 мл (2). Твин 80 применяют как поверхностно активный агент, способствующий отделению бактерий от частиц корма и предотвращающий их склеивание. Для подсчета обычно используют камеру Горяева - Тома, хотя можно применять и другие счетные камеры. Камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. На центральную часть стекла нанесена сетка. Площадь квадрата сетки указана на одной из сторон предметного стекла и соответствует 1/25 мм^2 (большой квадрат) или 1/400 мм^2 (малый квадрат). Часть предметного стекла, на которой нанесена сетка, на 0,1 мм ниже других сторон. Это глубина камеры и она всегда указывается на предметном стекле.

При работе с камерой необходимо соблюдать следующий порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Это указывает на то, что покровное стекло притерто к сторонам

камеры. Только при таком условии объем взвеси микроорганизмов, находящейся в камере, соответствует расчетному. После этого камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов. Суспензию вносят через бороздку камеры капилляром или пипеткой. Подсчет клеток начинают через 3-5 мин после заполнения камеры и осаждения клеток, которые при микроскопировании будут видны в одной плоскости.

Количество микроорганизмов подсчитывают с объективом 10× или 40×. С иммерсионным объективом работать нельзя, так как его фокусное расстояние меньше толщины стекла камеры. Обычно подсчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 маленьких квадратах сетки, перемещая последние по диагонали. Учитывают все микроорганизмы, лежащие в квадрате сетки, а также клетки, пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом 10, в противном случае исходную суспензию разводят водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных микроорганизмов должно быть не менее 600.

Точность определения зависит от того, насколько плотно пришлифовано предметное стекло к поверхности камеры. Поэтому подсчет микроорганизмов повторяют 3 - 4 раза, каждый раз заново монтируя камеру и заполняя ее исследуемой взвесью микроорганизмов. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры. Количество микроорганизмов в 1 мл исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$M = (a \cdot 10^3/hS) \cdot n,$

где M - число микроорганизмов в 1 мл суспензии; a - среднее количество клеток в квадрате сетки; h - глубина камеры в мм; S - площадь квадрата сетки в $мм^2$; 10^3 - коэффициент перевода $см^3$ в $мм^3$; n - разведение исследуемой суспензии.

Подсчет количества микроорганизмов в окрашенных мазках по методу Брида. Метод широко используется для определения численности микроорганизмов в содержимом рубца жвачных. Преимущества этого метода заключаются в том, что фиксированные и окрашенные препараты хорошо сохраняются, поэтому подсчет можно проводить в удобное для исследователя время. Приготовление препарата сводится к следующему. На хорошо обезжиренное предметное стекло с очерченным квадратом (10×10мм) наносят микропипеткой 0,01 мл разведенного до 10^{-3} содержимого рубца и равномерно распределяют на площади 100 $мм^2$. Из каждой пробы делают по три параллельных мазка. Количество клеток подсчитывают с иммерсионным объективом в квадратах окулярной сетки, которую помещают в окуляр между собирательной и глазной линзами. При отсутствии сетки подсчитывают число клеток в поле зрения микроскопа. Правила подсчета в квадратах окулярной сетки те же, что и при подсчете клеток в квадратах сетки счетной камеры.

Следует иметь ввиду, что клетки в мазке распределяются неравномерно: в центре их больше, чем по краям. Поэтому для получения среднего значения следует вести подсчет по диагонали квадрата. Чтобы результат был достоверным, клетки микроорганизмов рекомендуется подсчитывать не менее чем в 30 полях зрения. Количество микроорганизмов, содержащихся в 1 мл исследуемого субстрата, вычисляют по формуле:

$M = (aS_1/SV) \cdot n$,

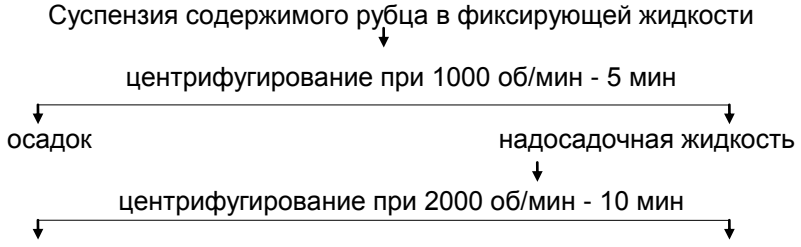
где M - количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата; a - среднее число микроорганизмов в квадрате окулярной сетки или поле зрения; S - площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения) в мкм^2; V - объем нанесенной на стекло суспензии в мл; S_1 - площадь приготовленного мазка в мкм^2; n - разведение исследуемого материала.

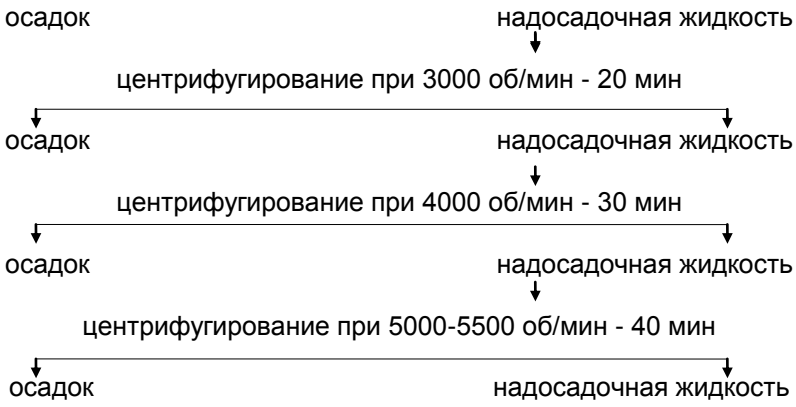
Площадь квадрата или поля зрения определяют с помощью объект - микрометра. Последний помещают на столик микроскопа вместо препарата и при том же увеличении, при котором проводили подсчет, определяют сторону квадрата окулярной сетки или диаметр поля зрения. Площадь поля зрения вычисляют по формуле $S=\pi r^2$.

4.1.2. Приготовление электронномикроскопических препаратов микроорганизмов из содержимого рубца жвачных

Электронная микроскопия нашла широкое применение в изучении морфологии и ультраструктуры широкого круга биологических объектов, в том числе и бактерий рубца. Этому в значительной степени способствует прогресс электронномикроскопических методов исследования и прежде всего разработка способов приготовления препаратов.

Разработанная во ВНИИФБиП с.-х. животных методика приготовления препаратов для электронной микроскопии (2) состоит в следующем. Содержимое рубца сразу после получения фильтруют через 4 слоя марли и фильтрат смешивают с равным объемом фиксирующей жидкости, содержащей 8 - 10% 40%-ного нейтрального формалина и 0,2% твина 80 в 90 мл дистиллированной воды. Во время фиксации, продолжающейся 24 - 48 ч, колбу с исследуемым материалом периодически встряхивают. После окончания фиксации смесь подвергают дифференциальному центрифугированию по следующей схеме:





Обычно для приготовления препаратов берут 450 мл суспензии рубцового содержимого в фиксирующем растворе. Осадок, полученный после центрифугирования при 1000 об/мин, состоящий в основном из частичек корма и простейших выбрасывают, а осадки, собранные при центрифугировании со скоростью 2, 3, 4 и 5 тысяч об/мин, именуемые фракциями бактерий рубца № 1, 2, 3 и 4 соответственно, подвергают дополнительной очистке. Для этого каждую фракцию бактерий суспендируют в 200 мл физиологического раствора (0,85%-ный раствор NaCl) и двукратно отмывают с помощью центрифугирования, режим которого, т.е. скорость и продолжительность обработки, сохраняют таким же, как и при первичном выделении. Затем отмытые осадки вновь суспендируют в 100 мл физиологического раствора, помещают в мешочки из целлофана и ставят на суточный диализ против дистиллированной воды. По окончании диализа суспензии разных фракций бактерий рубца разводят дистиллированной водой в соотношениях 1:1 и 1:2. Полученные микробные взвеси наносят на коллодиевые и формваровые пленки-подложки, которые предварительно монтируют на сетки-объектодержатели. Следует однако помнить, что при использовании для монтажа подложек (как коллодиевых, так и формваровых) на опорные сетки фильтровальной бумаги, на пленках не исключается образование трещин, разрывов и других дефектов, которые снижают качество препаратов. Поэтому в целях наиболее равномерного распределения исследуемых объектов по поверхности пленки несущую фильтровальную бумагу с покрытыми пленкой сетками перед нанесением на них бактериальных суспензий необходимо смочить или поместить на поверхность дистиллированной воды. В противном случае вода из взвеси через дефекты в пленке интенсивно поглощается сухой бумагой, что приводит к образованию искусственных конгломератов микроорганизмов.

Все операции, связанные с приготовлением препаратов, т.е. фиксацию, дифференциальное центрифугирование, очистку и высушивание выполняют при комнатной температуре.

Для повышения контрастности объектов их оттеняют металлами (вольфрам, палладий, золото) или контрастируют фосфорновольфрамовой кислотой.

При необходимости исследования ультратонкой структуры бактерий рубца с помощью сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии могут быть использованы также методы приготовления препаратов, описанные для простейших Огимото и Имаи (46).

4.2. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ РАБОТЫ СО СТРОГО АНАЭРОБНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ РУБЦА ЖВАЧНЫХ

В преджелудках жвачных поддерживается популяция смешанных микроорганизмов, большинство из которых является облигатными анаэробами, не растущими в факультативно-анаэробных условиях. Эти бактерии, по-видимому, не способны восстанавливать среду сами (53), но размножаются в окружающей среде, где окислительно-восстановительный потенциал (eH) поддерживается на низком уровне за счет метаболизма сопутствующих бактерий и простейших. Для того чтобы обеспечить рост этих микроорганизмов при их выделении и в чистых культурах, необходимо создать в среде высоковосстановленные безкислородные условия. В 1950 году Хангейт (54) обстоятельно описал технику выделения целлюлозолитических анаэробных рубцовых бактерий. В основу ее разработки были положены попытки создать в условиях in vitro физические, химические и питательные условия, обнаруженные в преджелудках жвачных. Особое внимание при этом было обращено на создание анаэробиоза. С некоторыми модификациями (47, 48) эти методы широко применяются для выделения и культивирования всех групп строго анаэробных бактерий, обнаруженных в рубце. Естественно, что состав сред при работе с различными группами микроорганизмов несколько изменяется, особенно при изучении их потребности в питательных веществах, но непреложным правилом техники работы было окончательное приготовление среды в анаэробной атмосфере и предотвращение дальнейшего контакта ее с кислородом, использование редуцирующих агентов для создания надлежащего значения eH, анаэробное взятие и разведение проб рубцового содержимого.

4.2.1. Газовые смеси и их очистка

Наиболее широко при работе с рубцовыми анаэробными микроорганизмами для насыщения раствора для разведений и питательных сред используют чистый углекислый газ и несколько реже применяют чистый азот или газовую смесь, состоящую на 90% из N_2 и на 10% из CO_2. Азот или его смесь с углекислотой применяются тогда, когда необходимы среды с низкой буферной способностью, а также в некоторых опытах in vitro, в которых CO_2 может быть ингибитором (например, определение микробной гидрогенирующей активности). При выделении из

рубцового содержимого метаногенных бактерий и изучении их свойств Смит и Хангейт (56) использовали для создания анаэробиоза и в качестве питательного субстрата газовую смесь, состоящую на 80% из водорода и на 20% из CO_2.

Выпускаемые промышленностью газы, даже высокой чистоты, могут содержать небольшие количества кислорода. Поэтому для того, чтобы добиться в средах анаэробных условий, необходимо освободить используемые для этих целей углекислоту или азот от остатков кислорода.

Освобождение от загрязнения газовых смесей или чистых газов может быть достигнуто в результате их пропускания через химические поглотители кислорода (например, хромовая кислота) или через раскаленную медную стружку, которая, окисляясь, связывает кислородные примеси. Следует отметить, что химические методы очистки газов широкого распространения не получили и в настоящее время во многих зарубежных лабораториях используют колонки с медной стружкой. Эти приборы сравнительно легко могут быть изготовлены практически в любой лаборатории. В лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП с.-х. животных для этих целей используют колонку из термостойкого кварцевого стекла. Трубка 65×1,5 см в средней ее части, длиной около 30 см, заполнена медной стружкой, которая удерживается в колонке с помощью неплотных пробок, изготовленных из асбестового шнура. Разогревание медной стружки осуществляется с помощью разъемной электропечи типа МА = 2/20, имеющей рабочее пространство размером 1,5×20 см. Максимальная рабочая температура 900^0С может быть достигнута в течение 15 - 25 мин. Для регулирования температуры в комплекте электропечи имеется реостат. Слабый поток CO_2 из баллона с помощью редуктора и резинового шланга подается в колонку и отводится из нее системой резиновых трубок либо в общий коллектор, либо к стеклянной форсунке (пастеровская пипетка), которая используется для насыщения сред и растворов в колбах и пробирках. Газ начинают продувать через колонку с момента включения печи с тем расчетом, чтобы вытеснить из колонки имеющийся там воздух и, таким образом, предотвратить окисление медной стружки.

Рабочая скорость потока газа должна быть небольшой и не превышать 400 мл/мин, так как при более высокой скорости прохождения газа через колонку удаление кислорода будет неполным. Проходя через раскаленную медную стружку кислород окисляет ее, что отчетливо видно по прогрессирующему потемнению. Окисленная стружка в значительной степени утрачивает свою редуцирующую способность и периодически должна восстанавливаться. При непрерывном пропускании чистых продажных газов необходимость в регенерации возникает приблизительно через 6 - 8 ч, но она может варьировать в зависимости от чистоты используемых газов. Регенерирование горячей колонки осуществляют путем продувания через нее газовой смеси, состоящей на 90% из водорода и на 10% из CO_2. В целях безопасности эта смесь из колонки должна отводиться в наружную атмосферу за пределы помещения.

Восстановление меди до желтовато-розового цвета обычно полностью завершается в течение нескольких минут. Необходимо отметить, что для освобождения газов от кислорода могут быть использованы колонки и других конструкций (55).

Пригодны для создания анаэробиоза в растворах и средах высокоочищенные, поверочные газовые смеси из азота и углекислоты, а также азот особой чистоты, выпускаемые Балашихинским кислородным заводом. Их преимущество состоит в абсолютной безопасности при проведении работ, поскольку эти газы не требуют предварительной очистки на колонке и регенерации медной стружки водородными смесями.

4.2.2. Редуцирующие агенты

Обычно для создания низкого окислительно-восстановительного потенциала в качестве редуцирующих агентов для большинства сред и растворов используют смесь солянокислого цистеина и сульфида натрия, каждый из которых используется в конечной концентрации 0,015%. Раствор редуцирующих агентов готовят следующим образом: 1,5 г солянокислого цистеина растворяют в небольшом количестве воды и регулируют pH до 10 с помощью 10%-ного раствора NaOH; затем к полученному раствору добавляют 1,5 г сульфида натрия ($Na_2S \cdot 9H_2O$)и доводят объем раствора до 100 мл дистиллированной водой. Стерилизацию осуществляют автоклавированием (121°C). Раствор редуцирующих агентов каждый раз при приготовлении сред и растворов используют только в свежем виде.

2,5%-ый раствор солянокислого цистеина в дистиллированной воде применяют в средах для обнаружения образования сульфида. В качестве предохраняющего реагента для SH-групп в средах может быть использован дитиотреитол в конечной концентрации 0,0001М (51)

4.2.3. Контроль окислительно-восстановительного потенциала

В качестве индикатора окислительно-восстановительного потенциала в среды и разбавители чаще всего включают резазурин, который обычно готовят в виде 0,1%-ного раствора в дистиллированной воде и добавляют с таким расчетом, чтобы его конечная концентрация составляла 0,0001%. 0,1%-ный раствор резазурина можно готовить впрок и сохранять в холодильнике при 4°C.

Контроль за состоянием восстановленности сред после внесения резазурина осуществляют по изменению их окраски. Окисленная форма резазурина окрашена в синий цвет. Образующийся необратимо при окислении резазурина промежуточный продукт резоруфин окрашен в розовый цвет, а его восстановленная форма - дигидрорезоруфин - бесцветна. Таким образом, восстановление протекает в две стадии: окисление резазурина (первая стадия) - необратимо, тогда как вторая стадия легко возвращается при наличии следов кислорода. Поэтому вос-

становленная среда всегда бесцветна, а окисленная окрашивается в розовый цвет. Следует сказать, что резазурин не является идеальным индикатором состояния восстановления. В низких концентрациях он показывает окислительно-восстановительные потенциалы выше - 0,042. При изучении метаногенных бактерий предпочтительным индикатором является феносафронин (49), поскольку он регистрирует более низкие потенциалы (E_0^1, pH 7,0 = - 0,252). Другие индикаторы, которые могут восстанавливаться при более низких потенциалах (например, бензилviологен E_0^1, pH 7,0 = - 0,359), являются токсичными в тех концентрациях, при которых удается наблюдать их цветовые изменения.

4.2.4. Приготовление питательных сред и растворов

Цельное рубцовое содержимое мало пригодно для микробиологических исследований и из него для проведения посевов необходимо приготовить разведения. Для приготовления разведений, как правило, используют минеральные растворы, содержащие восстановители, которые вместе с насыщением разбавителей углекислым газом и использованием резиновых пробок обеспечивают анаэробные условия.

В большинстве зарубежных лабораторий для приготовления сред и анаэробных разбавителей для разведений используют два минеральных раствора. Минеральный раствор № 1 содержит 0,6 г K_2HPO_4 в 100 мл дистиллированной воды. Минеральный раствор № 2 имеет следующий состав (г/100 мл): NaCl - 1,2; $(NH_4)_2SO_4$ - 1,2; KH_2PO_4 - 0,6; $CaCl_2$ (безводный) - 0,12; $MgS0_4 \cdot 7H_2O$ - 0,25 и дистиллированная вода - 100 мл (47).

Для приготовления разведений используют разбавитель следующего состава: минеральный раствор № 1 - 7,5 мл; минеральный раствор № 2 - 7,5 мл; цистеин $HCl \cdot H_2O$ - 0,05 г; Na_2CO_3 - 0,3 г; резазурин (0,1% раствор) - 0,1 мл; вода дистиллированная - 100 мл (47). Эту смесь разливают в колбы и пробирки и стерилизуют в автоклаве при 121^0C 20 мин. Сразу после автоклавирования ватные пробки в колбах и пробирках заменяют на резиновые, желательно из бутиловой резины, и после остывания до 45 - 50^0C насыщают свободной от кислорода углекислотой или другой газовой смесью до исчезновения розовой окраски разбавителя.

В своей работе мы используем для разведений раствор Дейтча и соавт. (52) в следующей модификации (г/литр): $(NH_4)_2SO_4$ - 0,5; K_2HPO_4 - 0,5; KH_2PO_4 - 0,2; $CaCl_2$ (безводный) - 0,05; $MgSO_4$ - 0,05; NaCl - I,0; $NaHCO_3$ - 4,0; солянокислый цистеин - 0,1; твин 80 - 0,1 мл; 1 мл 0,1%-ного раствора резазурина и дистиллированная вода - 1 литр. Твин 80 вводят в разбавитель для того, чтобы способствовать разъединению бактерий, фиксированных на частичках корма, а также находящихся в рубце в виде скоплений большого числа клеток, и предотвратить их склеивание в дальнейшем. Приготовленный из вышеперечисленных компонентов раствор разливают в колбы по 90 мл и в пробирки по 9 мл,

закрывают ватными пробками и стерилизуют при 0,5 атм. (117^0C) в течение 30 мин. Далее поступают также, как и в первом случае.

Бактерии рубца имеют сложные пищевые потребности и нуждаются в факторах роста и анаэробиозе. С этой целью для обеспечения хорошего роста бактерий в питательные среды вводят осветленную рубцовую жидкость, смесь ЛЖК, восстановители, витамины, гемин и другие компоненты, приготовление которых приводится ниже.

Рубцовую жидкость получают путем фильтрования содержимого рубца, взятого от крупного рогатого скота, содержащегося на сеноконцентратном рационе, через 2 слоя марли. Фильтрат, освобожденный от крупных кормовых частиц, разливают в пластиковые бутылки, замораживают и хранят в холодильнике при -20^0C. Перед использованием ее оттаивают и центрифугируют при 25000 g в течение 10 мин (осветленная рубцовая жидкость)

Смесь ЛЖК используют в следующей прописи: уксусная кислота - 17 мл ($2{,}9\times10^{-2}$М); пропионовая кислота - 6 мл ($8{,}0\times10^{-3}$М); масляная кислота - 4 мл (4.3×10^{-3}М); изомасляная кислота - 1 мл ($1{,}1\times10^{-3}$М); н - валериановая, изовалериановая и DL-α-метилмасляная кислоты по 1 мл каждой (9×10^{-4}М).

Раствор гемина. Растворяют 50 мг гемина в 1 мл 1н NaOH и доводят объем водой до 100 мл. Добавляют 1 мл этого раствора к I00 мл среды.

Раствор восстановителей. Растворяют 2,5 г L-цистеина $HCl \cdot H_20$ в 50 мл дистиллированной воды и регулируют pH до 10 с помощью 10%-ного раствора едкого натра. Затем быстро добавляют 2,5 г $Na_2S \cdot 9H_2O$ и доводят объем до 200 мл дистиллированной водой. Раствор помещают в колбу и доводят до кипения в атмосфере азота. Закрепляют пробку проволокой и автоклавируют при 121^0C в течение 15 мин.

Раствор витамина K_1. Растворяют 0,15 мл витамина K_1 в 30 мл 95%-ного этанола. Добавляют 0,02 мл основного раствора на 100 мл среды, затем среду кипятят до ее разлива и автоклавируют. Основной раствор витамина K_1 сохраняют в холодильнике. Хранят в коричневой бутылке и после месячного хранения выбрасывают.

Для культивирования, подсчета количества жизнеспособных клеток и выделения большинства типов рубцовых бактерий Брайнт и Барки (47) предложили среду общего назначения с рубцовой жидкостью. Эта среда, получившая название глюкозно-целлобиозного агара с рубцовой жидкостью (среда RGCA), имеет следующий состав: минеральный раствор № 1 - 7,5 мл; минеральный раствор № 2 - 7,5 мл; резазурин 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; дистиллированная вода - 50 мл; агар - 2 г; рубцовая жидкость - 40 мл; глюкоза - 0,05 г; целлобиоза - 0,05 г; цистеин солянокислый - 0,05 г; Na_2CO_3, 8%-ный раствор - 5 мл. В 1961 году она была улучшена и сейчас известна как среда 98-5 Брайнта и Робинсона (48). Эта модификация имеет следующий состав: минеральный раствор № 2 - 7,5 мл; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,l мл; дистиллированная вода - 50 мл; агар (Bacto-agar, Difco) - 2 г; рубцовая жидкость - 40 мл;

глюкоза - 0,05 г, целлобиоза - 0,05 г; растворимый крахмал - 0,05 г; раствор солянокислого цистеина · H_2O - Na_2S · $9H_2O$ - 0,5 мл; Na_2CO_3, 8%-ный раствор - 5 мл.

Среду готовят следующим образом. Объединяют вместе минеральные растворы № 1 и № 2, рубцовую жидкость, воду, раствор резазурина, растворяют углеводы и регулируют pH до 6,8 - 7,0 1н раствором NaOH. Добавляют агар и кипятят до его растворения. Затем среду охлаждают в водяной бане до 50-60^{0}C и насыщают свободным от кислорода CO_2. Колбу (флакон) закрывают резиновой пробкой и фиксируют ее проволочной петлей или каким-либо другим способом и автоклавируют при 121^{0}C в течение 20 мин. После стерилизации среду охлаждают до 45 - 50^{0}C в водяной бане и опять насыщают CO_2. Затем в среду добавляют растворы восстановителей и бикарбоната натрия, перемешивают и асептически разливают в стерильные культуральные пробирки, в которых весь воздух вытеснен свободным от кислорода CO_2, и закрывают стерильной резиновой пробкой. Эта техника приготовления так называемых предварительно восстановленных сред применяется всегда и считается стандартной в рубцовой микробиологии. Буферная способность сред обычно обеспечивается бикарбонатом натрия, раствор которого насыщается CO_2 до pH 7,0. Обычно используют растворы $NaHCO_3$ или Na_2CO_3 в 8%-ной концентрации. Этот раствор необходимо использовать каждый раз свежим. Стерилизацию осуществляют через фильтр Зейтца или автоклавируют (121^{0}C в течение 15 мин). Если требуются среды с низкой буферной способностью, то концентрацию бикарбоната уменьшают до 0,06%, а газовую фазу заменяют на азот. KH_2PO_4 и K_2HPO_4 в количествах, вносимых в среду, обеспечивают ослабление ее буферной способности. Раствор редуцирующих агентов перед добавлением в среду также тщательно насыщают углекислым газом.

В 1966 году среда 98 - 5, имеющая неопределенный состав в силу наличия в ней большого количества рубцовой жидкости, была модифицирована Калдвелом и Брайнтом (50). Рубцовую жидкость в ней заменили дрожжевым экстрактом, триптиказой, смесью ЛЖК, добавили дрожжевой экстракт и гемин. Эта среда известна как М - 10 и имеет следующий состав: минеральный раствор № 1 - 7,5 мл; минеральный раствор № 2 - 7,5 мл; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; дистиллированная вода - 50 мл; агар-агар - 2 г; триптиказа (BBL) - 0,2 г, дрожжевой экстракт (Difco) - 0,05 г; глюкоза - 0,05 г; целлобиоза - 0,05 г; растворимый крахмал - 0,05 г; раствор солянокислого цистеина · H_2O - Na_2S $9H_2O$ - 0,5 мл; смесь ЛЖК - 0,31 мл; раствор гемина - 1 мл; Na_2CO_3, 8%-ный раствор - 5 мл.

Приготовление среды ведут также как описано выше. При этом для ролл - тьюб (roll tube) мы используем пробирки размером 15×150 мм и пробки № 14.

4.2.5. Приготовление разведений и посев методом ролл-тьюб (roll tube culture)

Перед приготовлением разведений раствор Дейтча в колбах и пробирках насыщают углекислотой до исчезновения розовой окраски. Пробу содержимого рубца, соблюдая анаэробиоз, тщательно перемешивают и в количестве 10 мл переносят в колбу с 90 мл восстановленного разбавителя и встряхивают в течение 5 мин. Полученное таким способом разведение исследуемого материала 1:10 в количестве 1 мл пипеткой переносят в пробирку с 9 мл раствора и встряхивают 30 сек. Таким образом, получают разведение 1:100 или 1×10^{-2}. Все последующие разведения готовят также перенесением 1 мл предыдущего разведения в пробирку с 9 мл раствора и встряхиванием в течение 30 сек.

Для того чтобы уменьшить погрешности в процессе работы, желательно для приготовления каждого последующего разведения пользоваться чистой пипеткой. Все процедуры по отбору проб, приготовлению разведений и посеву необходимо проводить стерильно с целью предотвращения загрязнения проб посторонней микрофлорой.

Перед использованием среду расплавляют в аппарате Коха или в автоклаве текучим паром, охлаждают до 45^0С, вносят в нее необходимые добавки (см. выше), вновь насыщают в течение 30 сек углекислым газом и до посева поддерживают в расплавленном состоянии в водяной бане с постоянной температурой 45 - 47^0С.

Исследуемый материал в количестве 0,5 мл необходимого разведения высевают в расплавленную среду пипеткой, не допуская выдувания ртом, и снова насыщают CO_2. Это насыщение является очень важным, так как, в конечном итоге, большая поверхность агара после распределения по стенкам пробирки будет соприкасаться с газовой атмосферой в пробирке и остаточный кислород будет причиной окисления среды.

После посева пробирки быстро закрывают резиновыми пробками, среду тщательно перемешивают с посевным материалом и распределяют равномерно по стенкам пробирки, установленной в горизонтальном положении. После этого пробирку помещают в сосуд с холодной водой и быстро вращают вокруг продольной оси до тех пор, пока среда равномерно распределится по стенке пробирки и застынет. Необходимо отработать метод вращения, так чтобы резиновая пробка с внутренней стороны также была покрыта слоем застывшей среды, что будет препятствовать проникновению кислорода воздуха извне.

Если среда правильно распределена, то во время инкубации в термостате при 38 - 39^0С колонии микроорганизмов равномерно растут по всей площади пробирки, хорошо видны и их можно подсчитать и, в случае необходимости, выделить чистую культуру. Пробирки инкубируют вертикально. Ни в коем случае их нельзя класть горизонтально в процессе или после инкубации, так как конденсат, образующийся в пробирке, будет омывать поверхность колоний и таким образом загрязнять

всю пробирку. Посевы инкубируют в термостате до 14 дней, а подсчеты колоний обычно делают на 2, 5, 10 и 14 дни после посева.

4.3. РЕЦЕПТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИЙ РУБЦА

4.3.1. Среды для лактобацилл

Среда LM. Триптиказа (BBL) - 1 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,5 г; триптоза (Дифко) - 0,3 г; KH_2PO_4 - 0,3 г; K_2HPO_4 - 0,3 г; солевой раствор R [a)] - 0,5 мл; твин 80 - 0,1 г; ацетат натрия - 0,1 г; L-цистеин HCl · H_2O - 0,02 г; агар-агар - 2 г; глюкоза - 0,5 г; дистиллированная вода - 100 мл; pH 6,3. [a)] Солевой раствор R: $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 11,5 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,68 г; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 2,4; дистиллированная вода - 100 мл.

Среда MRS по Де Манну с соавт.(57). Пептон (Oxoid) - 1 г; мясной экстракт - Lab-Lemco (Oxoid) - 1 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,5 г; глюкоза - 2 г; твин 80 - 0,1 г; K_2HPO_4 - 0,2 г; $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ - 0.5 г; триаммонийцитрат - 0,2 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,02 г; $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ - 0,005 г дистиллированная вода - 100 мл; pH 6,0-6,5.

Селективная SL среда Рогозы с соавт. (73). Триптиказа (BBL) - 10 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 5 г; KH_2PO_4 - 6 г; цитрат аммония $(NH_4)_2HC_6H_5O_7$ - 2 г; солевой раствор [x] - 5 мл; глюкоза - 20 г; твин 80 - 1 г; ацетат натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) - 25 г; ледяная уксусная кислота (99,5%) - 1,32 мл; агар - 15 г; дистиллированная вода - 1000 мл; pH 5,4. Если все ингредиенты среды взяты правильно, то дополнительно регулирования pH не требуется.

[x] Солевой раствор имеет следующий состав: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 11,5 г; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ - 2,4 г или $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 2,86 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,68 г; дистиллированная вода - 100 мл. При стоянии в холодильнике солевой раствор может отстаиваться и восстанавливается простым встряхиванием.

SL агар Рогозы в модификации Тараканова (3). Триптический гидролизат казеина - 10 г; дрожжевой экстракт - 5 г; KH_2PO_4 - 6 г; цитрат аммония двухзамещенный - 2 г; солевой раствор - 5 мл; глюкоза - 20 г; твин 80 - 1 мл; ацетат натрия - 25 г; ледяная уксусная кислота (99,5%) - 1,32 мл; мясо-пептонный бульон - 100 мл; цистеин солянокислый - 0,5 г; агар - 20 г; капустный отвар - 900 мл; pH среды 5,4.

Капустный отвар готовят следующим образом: 200 г нашинкованной капусты заливают 1 л водопроводной воды и кипятят в течение 10 минут. Затем отвар охлаждают до 60^0C, фильтруют через марлю, разливают по бутылкам и стерилизуют при 121^0C в течение 30 мин.

Для приготовления 1 л среды навеску агара расплавляют отдельно в 400 мл капустного отвара. Растворенный в 10 мл дистиллированной воды твин-80 вносят в колбу с 400 мл капустного отвара, к которому добавляют все остальные ингредиенты. Полученный раствор доводят до кипения и смешивают с расплавленным агаром. Объем смеси доводят

до 1 л капустным отваром и готовую среду стерилизуют при 121^0C в течение 30 мин. Среда обладает высокой селективностью и применяется для первичного выделения лактобацилл из пищеварительного тракта с.-х. животных и птицы.

4.3.2. Среды для бифидобактерий

BL агар по Митсуока и соавт. (68-69). Мясной экстракт Lab-Lemco (Oxoid) - 0,3 г; протеозный пептон №3 (Дифко) - 1 г; триптиказа (BBL) - 0,5 г; фитон (BBL) - 0,3 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,5 г; настой печени - 15 мл; глюкоза - 1 г; растворимый крахмал - 0,5 г; раствор А[а] - 1 мл; раствор В[б] - 1 мл; твин 80 - 0,1 г; агар-агар - 1,5 г; 5%-ый раствор L-цистеина солянокислого - 1 мл; кровь лошади - 5 мл; дистиллированная вода - 76,5 мл.

[а)] K_2HPO_4 - 10%; KH_2PO_4 - 10%;[б)] $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,4%; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,02%; NaCl - 0,02%; $MnSO_4$ - 0,015%.

Селективный BS агар для бифидобактерий по Митсуока (69). К 100мл BL агара добавляют 5 мл BS раствора. BS раствор содержит (г/100 мл): пропионовокислый натрий - 30; сульфат паромомицина - 0,1; сульфат неомицина - 0,4 и хлорид лития - 6 г;

Эугонагар, модифицированный для бифидобактерий по Вира и Думофф (76). Триптиказа (BBL) - 1,5 г; фитон (Дифко) - 0,5 г; NaCl - 0,4 г; L-цистин - 0,07 г; декстроза - 0,55 г; мальтоза - 1 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,5 г; сульфат натрия - 0,02 г; раствор гемина - 1 мл; агар-агар - 1,5 г; дистиллированная вода - 100 мл. Разливают и стерилизуют при 118^0C - 15 минут.

Триптиказа-фитон-глюкозная (TPG) среда для бифидобактерий по Скардови и соавт. (74). Триптиказа (BBL) - 1 г; фитон (BBL) - 0,5 г; глюкоза - 1,5 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,25 г; цистеин солянокислый - 0,05 г; K_2HPO_4 - 0,2 г; $MgCl_2$ - 0,05 г; $ZnSO_4$ - 0,025 г; $CaCl_2$ - 0,015 г; $FeCl_3$ - следы; агар - 1,5 г; дистиллированная вода - 100 мл.

4.3.3. Среды для стрептококков

Дрожжево - крахмальный агар (YSA) по Мак Ферсону (67). Бактотриптоза (Дифко) - 1 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 1 г; K_2HPO_4 - 0,2 г; агар - 2 г; 5% раствор картофельного крахмала [а)] - 15 мл; дистиллированная вода - 85 мл.

[а)] 5%-ный раствор картофельного крахмала добавляют в каждую пробирку после стерилизации среды при 121^0C в течение 15 мин. Этот раствор готовят путем непрерывного помешивания крахмала и водной смеси в кипящей водяной бане вплоть до разрыва крахмальных зерен и загустения смеси. Стерилизуют при 112^0C в течение 30 минут.

Дрожжево-триптиказно-глюкозно-крахмальный агар (YTGS агар) для стрептококков по Огимото (70). Триптиказа (BBL) - 1,5 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,5 г; агар - 1,5 г; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1

мл; глюкоза - 1 г; растворимый крахмал - 1,5 г; цистеин солянокислый - 0,05 г; Na_2CO_3, 8%-ный раствор - 5 мл; дистиллированная вода - 100 мл.

4.3.4. Среды для целлюлозолитических бактерий

Среда с целлюлозой и рубцовой жидкостью по Хангейту (65). KH_2PO_4 - 0,02 г; K_2HPO_4 - 0,03 г; $MgSO_4$ - 0,01 г; $CaCl_2$ - 0,01 г; NaCl - 0,1 г; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,1 г; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; цистеин солянокислый - 0,02 г; Na_2CO_3 - 0,4 г; рубцовая жидкость - 30 мл; порошок целлюлозы[x] - 1 г; дистиллированная вода - 70 мл.

[x] Фильтрованная бумага Ватман N1 в виде водной суспензии, размолотая в шаровой мельнице, или порошок, размолотый на молотковой мельнице.

Среда с целлюлозой для руминококков по Латхам и Волину (66). Целлюлоза - 0,2 г; триптиказа (BBL) - 0,5 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,1 г; минеральный раствор N 1 - 7,5 мл; минеральный раствор N2 - 7,5 мл; резазурин 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; смесь ЛЖК, раствор - 0,1 мл; Na_2CO_3, 8%-ный раствор - 5 мл; цистеин солянокислый - 0,05 г; дистиллированная вода - 100 мл. Целлюлозу готовят как и для предыдущей среды.

4.3.5. Среды для метаногенных бактерий

Среда для метаногенов по Эдвардсу и Мак Брайду (58). Минеральный раствор N1 - 7,5; минеральный раствор N2 - 7,5; цистеин солянокислый - 0,05 г; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,15 мл; триптиказа - 0,4 г; рубцовая жидкость - 30 мл; агар - 1,5 г; дистиллированная вода - 100 мл.

pH среда для метаногенов по Пэйнтеру и Хангейту (71). Рубцовая жидкость - 30 мл; KH_2PO_4 - 0,05 г; K_2HPO_4 - 0,05 г; NaCl - 0,1 г; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,05 г; $MgSO_4$ - 0,05 г; $CaCl_2$ - 0,01 г; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; $NaHCO_3$ - 0,5 г; цистеин солянокислый - 0,03 г; Na_2S - 0,03 г; дистиллированная вода - 70 мл. Для предотвращения доступа кислорода при работе с этой средой используют газовую смесь, состоящую на 80% из H_2 и 20% CO_2.

4.3.6. Среды для Vibrio succinogenes

FF среда по Волину и соавт. (78). $(NH_4)_2SO_4$ - 0,1 г; K_2HPO_4 - 0,5 г; фумаровая кислота - 0,3 г; натрий муравьинокислый - 0.3 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,1 г; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 0,02 г; $FeSO_4$ - 0,001 г; дистиллированная вода - 100 мл.

Автоклавированный тиогликолят натрия добавляют асептически до посева в конечной концентрации 0,05%; pH 7,0 до 7,2.

Среда для первичного обогащения V. succinogenes по Волину и соавт. (78). NH_4Cl - 0,1 г; K_2HPO_4 - 0,04 г; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ - 0,02 г; натрий муравьинокислый - 0,5 г; $FeSO_4$ - 0,001; феноловый красный - 0,0003

г;$NaHCO_3$ - 0,078 г; $Na_2S \cdot 9H_2O$ - 0,02 г; витамин B_{12} - 0,02 мкг/мл; р-аминобензойная кислота - 0,3 мкг/мл; дистиллированная вода - 100 мл.

Среду асептически насыщают смесью из 95% N_2 и 5% CO_2 до pH 7,2 - 7,4.

Среда VSY - 4 по Юшинари (79). Дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,4 г; натрий муравьинокислый - 100 мМ; калий фосфорнокислый - 25 мМ; натрий янтарнокислый - 10мМ; дистиллированная вода - 100 мл; pH 7,0. Автоклавированный 0,5%-ный раствор тиогликолята натрия добавляют асептически до конечной концентрации 0,05%.

4.3.7. Среды для сульфатредуцирующих бактерий

Среда B по Хьюсингху с соавт. (64). Дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,1 г; рубцовая жидкость - 10 мл; лактат натрия, 70%-ный раствор - 0.5 г; тиогликолят натрия - 0,1 г; Na_2CO_3 - 0,4 г; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; агар - 1,5 г; дистиллированная вода - 100 мл; pH 6,8.

Среда C по Хьюсингху с соавт. (64). K_2HPO_4 - 0,05 г; NH_4Cl - 0,1 г; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0,01 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,006 г; лактат натрия, 70%-ный раствор - 0,5 г; рубцовая жидкость - 10 мл; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; Na_2S - 0,008 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,0001 г; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,7 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,35 г; цистеин солянокислый - 0,05 г; Na_2CO_3, 8%-ный раствор - 5 мл; дистиллированная вода - 100 мл;. pH 6,8.

4.3.8. Среды для Megasphaera

Улучшенный клостридиальный агар (RCM) по Гизеке и соавт. (59). Дрожжевой экстракт - 0,3 г; мясной экстракт - 1 г; пептон - 1 г; декстроза - 0,5 г; растворимый крахмал - 0,1 г; ацетат натрия - 0,3 г; цистеин солянокислый - 0,05 г; агар - 1,35 г; дистиллированная вода - 100 мл; pH 6,8.

Для первичного выделения Megasphaera используют газовую смесь из 5% CO_2 + 95% N_2.

Полужидкая тиогликолятная среда по Хобсону с соавт. (62). Бактоказитон - 0,3 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,1 г; L-цистеин солянокислый - 0,015 г; тиогликолевая кислота - 0,006 г; NaCl - 0,1 г; агар - 0,15 г; лактат натрия, 70%-ный раствор - 0,3 мл; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; дистиллированная вода - 100 мл; pH 7,0.

Дрожжево-глюкозно-кровяной агар (YGB) по Вернеру (77). Дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,5 г; триптиказа (BBL) - 1 г; мясной экстракт - 0,2 г; глюкоза - 0,2 г; NaCl - 0,5 г; агар - 2 г; дефибринированная кровь - 5 мл; дистиллированная вода - 100 мл.

4.3.9. Среда для Selenomonas

Среда M по Тивари с соавт. (75) содержит: минеральный раствор N1 - 2 мл; минеральный раствор N2 - 2 мл; маннитол - 0,2 г; дрожжевой экстракт - 0,1 г; триптиказа - 0,5 г; ацетат натрия - 0,1 г; L - цистеин солянокислый - 0,08 г; агар - 2 г; н - валериановая кислота - 0,03 г; $FeSO_4 \cdot$

$7H_2O$ - 0,05 г; Na_2CO_3, 8%-ный раствор - 5 мл; дистиллированная вода - 100 мл; pH 7,0.

4.3.10. Среда для Anaerovibrio

Среда с глицеролом по Хендерсону (60). Дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,6 г; гидролизат казеина (Оксоид) - 0,75 г; глицерол, 5%-ный раствор - 10 мл; K_2HPO_4, 0,3%-ный раствор - 15 мл, KH_2PO_4, 0,3%-ный раствор - 15 мл; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; цистеин солянокислый - 0,05 г; бикарбонат натрия - 6 г; дистиллированная вода - 70 мл.

4.3.11. Среда для липолитических бактерий

Среда по прописи Хендерсона (61) содержит: минеральный раствор № 1 - 7,5 мл; минеральный раствор № 2 - 7,5 мл; рубцовая жидкость - 40 мл; цистеин солянокислый - 0,05 г; $NaHCO_3$ - 0,4 г; резазурин 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; льняное масло - 1 мл; агар - 2 г; дистиллированная вода - 50 мл.

Эмульсии готовят путем диспергирования 1 мл льняного масла или 600 мг трилаурина в 20 мл воды, используя Dawe Soniprobe 1130A с максимальной мощностью до 4 мин. Когда приготовляют трилауриновые эмульсии, воду несколько подогревают до расплавления трилаурина перед озвучиванием. Эмульсию (10 мл/100 мл среды) добавляют к оставшимся компонентам среды, которую нагревают для их растворения.

4.3.12. Среда для Veillonella

Триптиказо - дрожжево - лактатный агар по Огимото (70) имеет следующий состав: триптиказа (BBL) - 0,5 г; дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,3 г; лактат натрия - 1,25 мл; основной фуксин, 2%-ный раствор - 0,1 мл; агар - 1,5 г; тиогликолят натрия - 0,75 г; дистиллированная вода - 100 мл; pH 7,0

4.3.13. Среда для Lampropedia

Дрожжево - трипто - ацетатный агар (YTA) по Прингшейму (72) имеет следующий состав: дрожжевой экстракт (Дифко) - 0,1 г, триптон (Дифко) - 0,1 г; ацетат натрия - 0,2 г; агар - 1,5 г; дистиллированная вода - 100 мл.

4.3.14. Среда для субкультивирования

Бульонная среда для субкультивирования (пересевов) по Холдеману с соавт. (63) содержит: рубцовая жидкость - 30 мл; раствор солей [a)] - 50 мл; арабиноза - 0,1 г; целлобиоза - 0,1 г; фруктоза - 0,1 г; глюкоза - 0,1 г; мальтоза - 0,1 г; крахмал - 0,1 г; пируват - 0,1 г; желатина - 0,3 г; агар - 0,075 г; пептон - 0,05 г; дрожжевой экстракт - 0,05 г; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,05 г; L-цистеин солянокислый - 0,05 г; раствор гемина - 1

мл; витамин K_1 - 0,02 мл; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,4 мл; дистиллированная вода - 20 мл.

[a)]Солевой раствор: $CaCl_2$ (безводный) - 0,2 г; $MgSO_4$ (безводный) - 0,2 г; K_2HPO_4 - 1 г; KH_2PO_4 - 1 г; $NaHCO_3$ - 10 г; NaCl - 2 г в 1000 мл дистиллированной воды.

4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА ЖВАЧНЫХ

Одним из наиболее важных биохимических процессов, осуществляемых бактериями рубца жвачных, является расщепление клетчатки. Оно осуществляется микроорганизмами разных систематических групп, среди которых обнаружены как палочковидные, так и кокковидные микроорганизмы. Целлюлозолитические палочки отнесены к видам: Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens, Clostridium lochheadii, Clostridium longisporum, Cillobacterium cellulosolvens, палочкам Омелянского и ацетигенным палочкам. Кокковидные целлюлозолитические бактерии принадлежат к видам Ruminococcus albus и Ruminococcus flavefaciens. В преджелудках жвачных обнаружены также целлюлозолитические грибы и некоторые аэробные виды разрушающих клетчатку бактерий, но их значение в ферментации этого субстрата, по-видимому, невелико, так как рубец является анаэробной системой.

Для выделения чистых культур анаэробных целлюлозолитических бактерий рубца в лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП с.-х. животных используются методы in vitro и in vivo, особенности которых приводятся ниже.

4.4.1. Метод in vitro

Свежевзятое содержимое рубца фильтруют через 4 слоя марли и засевают в количестве 0,1 мл в 10 мл среды Хангейта (88), которая имеет следующий состав: $(NH_4)_2SO_4$ - 0, 5 г; K_2HPO_4 - 0,5 г; KH_2PO_4 - 0,2 г; $CaCl_2$ (безводный) - 0,05 г; $MgS0_4$ - 0,05 г; NaCl - 1,0 г; дистиллированная вода - 500 мл; рубцовая жидкость - 500 мл; pH среды 7,2.

Среду разливают по 10 мл в пробирки с полосками фильтровальной бумаги размером 10x0,5 см и стерилизуют при 121^0C 30 мин. Рубцовую жидкость, используемую в качестве компонента среды, предварительно фильтруют через 4 слоя марли и автоклавируют. Перед засевом среду в течение 1 мин насыщают углекислым газом и пробирки закрывают резиновыми пробками.

Посевы на среде Хангейта выдерживают в термостате при 39^0C до тех пор, пока не начнется интенсивное разрушение фильтровальной бумаги. Обычно это происходит на 2 - 3 сутки после посева. Затем культуру пересевают на среду Скотта и Дехорити (97) в следующей модификации (8): K_2HPO_4 - 0,9 г; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,9 г; NaCl -0,9 г; $CaCl_2$ - 0,05 г; $MgSO_4$ - 0,05 г; $MnSO_4$ - 0,02 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,02 г; $ZnS0_4$ - 0,002 г; $CoCl_2$ - 0,002 г; натрий изовалериановокислый - 0,087 г; натрий изомас-

лянокислый - 0,082; натрий валериановокислый - 0,087 г; и дистиллированная вода - 1 литр. Среду разливают по 10 мл в пробирки с полосками фильтровальной бумаги (10×0,5 см) и стерилизуют при 121^{0}С 30 мин. Непосредственно перед посевом в каждую пробирку со средой стерильно добавляют 8%-ный раствор $NaHCO_3$ - (0.5 мл), 10%-ный раствор солянокислого цистеина (0,1 мл) и 0,1 мл раствора витаминов.

Раствор витаминов готовят путем разведения в 100 мл воды 20мг солянокислого тиамина, 20 мг рибофлавина, 20 мг пиридоксина, 1 мг парааминобензойной кислоты, 0,5 мг биотина, 0,5 мг фолиевой кислоты и 0,05 мг витамина B_{12}. Раствор витаминов после стерилизации фильтрованием хранят при +4^{0}С.

После добавления в среду всех перечисленных ингредиентов, каждую пробирку насыщают в течение 1 мин газообразной углекислотой и производят посев. Набор минеральных солей в указанных дозировках и насыщение углекислым газом обеспечивают необходимый pH среды.

При выделении целлюлозолитических бактерий Грызлова и Корнилов (7), а также Лищенко (11) использовали вторую среду, в состав которой входили те же количества указанных неорганических солей, но на один литр среды добавляли по 14,9 мг валериановокислого и изовалериановокислого натрия, 14,8 мг изомаслянокислого натрия, 8,8 мг капроновокислого натрия и 20 мг триптического гидролизата казеина. Источником углевода в среде служит целлюлоза в виде полоски фильтровальной бумаги. Перед посевом в каждую пробирку с этой средой приливают 0,5 мл 8%-ного раствора углекислого натрия, 0,1мл 5%-ного раствора сульфида натрия и 0,1 мл раствора витаминов.

Со среды Хангейта культуры пересевают одновременно на обе вышеуказанные среды. В дальнейшем пересев производят на ту среду, на которой отмечается рост бактерий.

После 3 - 5 пересевов на среду Скотта и Дехорити, когда в культуре начинают преобладать микроорганизмы одной морфологической формы, что выявляется путем микроскопирования окрашенных по Граму мазков, производят посев на плотную питательную среду того же состава, что и жидкая среда, но целлюлозу в ней заменяют 0,5% целлобиозы.

Посев на плотную среду осуществляют следующим способом: 5 мл расплавленной питательной среды наливают тонким слоем в чашки Петри и дают застыть. После этого на поверхности агара петлей размазывают кусочек уже начинающей распадаться фильтровальной бумаги, извлеченной из жидкой среды. Тут же заливают в чашку 15 мл расплавленной и охлажденной до 45^{0}С агаровой среды, в которую предварительно были добавлены растворы витаминов, углекислого натрия и цистеина. Чашки после застывания агара помещают в анаэростат, который заполняют углекислым газом и ставят в термостат при 39^{0}С. После 3 - дневной инкубации разнотипные колонии отсевают на жидкую среду. Чистоту выделенных культур проверяют микроскопически.

4.4.2. Метод in vivo

Этот оригинальный метод выделения целлюлозолитических микроорганизмов, предусматривающий использование в качестве инкубатора изолированный участок рубца, впервые применен Грызловой и Коленько (6). В изолированном участке рубца, сохранившем нервную и кровеносную связь с основным рубцом, имеющим с последним одинаковую силу и частоту сокращений, условия для культивирования рубцовых бактерий приближаются к идеальным. В этом случае решающим фактором является питательная среда, от подбора которой зависит исход опыта.

Для проведения исследований необходимо животное (овца или баран) с изолированным по методу Алиева участком рубца и с хроническими фистулами как основного рубца, так и изолированного его отдела. В изолированный участок для предохранения слизистой от высыхания ежедневно вливают 60-100 мл стерильной искусственной слюны, приготовленной по прописи Столкап (99): NaH_2PO_4 - 26,25 г; Na_2CO_3 - 26,25 г; KCl - 3,75 г; NaCl - 3,75 г; $MgS0_4$ - 1,13 г; $CaCl_2$ - 0,38 г и дистиллированной воды 1 литр. Перед опытом полость изолированного рубца промывают спиртом, разведенным до 30%-ной концентрации искусственной слюной, а затем проводят посев. Для этого 20-30 мл рубцовой жидкости, взятой у этого же животного, смешивают с питательной средой в соотношении 1:3 и вводят через фистулу в изолированный участок рубца. В последующие дни в изолированный рубец заливают ежедневно только питательную среду в количестве 60-100 мл. Питательную среду готовили по прописи Брайнта и Робинсона (83) в следующей модификации: KH_2PO_4 - 0,9 г; NaCl - 0,9 г; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,9 г; $CaCl_2$ - 0,09 г; $MgCl_2$ - 0,09 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,04 г; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,015 г; $CoCl_2$ - 0,015 г; Na_2CO_3 - 4,0 г; $Na_2S \cdot 9H_20$ - 0,5 г; $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ - 3,06 г; натрий валериановокислый - 0,0187 г; натрий изовалериановокислый - 0,0187 г: цистеин солянокислый - 0,5 г; тиамин солянокислый - 2 мг; рибофлавин - 2 мг; пиридоксин - 2 мг; парааминобензойная кислота - 0,1 мг; фолиевая кислота - 0,5 мг; биотин - 0,005 мг и дистиллированная вода 1 литр. В качестве углеводных источников среда содержит 0,5% либо порошка фильтровальной бумаги, либо целлобиозы; pH среды 7,2. Стерилизация дробная текучим паром.

Пробы материала для бактериологического анализа из изолированного участка рубца берут на 1, 3, 7 и 14-е сутки после посева. В первые и третьи сутки после посева в содержимом изолированного участка рубца наблюдается развитие различных форм микроорганизмов, но затем происходит отмирание одних видов бактерий и преобладание других. К 14-му дню в изолированном участке рубца обнаруживаются только грамположительные руминококки. При использовании в опытах среды с целлобиозой накопление чистой культуры целлюлозолитических бактерий идет интенсивно и уже на третьи сутки опыта микрофлора в изолированном отделе рубца бывает представлена целлюлозолитическими руминококками.

Использование описанных выше методов выделения и культивирования анаэробных целлюлозолитических микроорганизмов позволило выделить из содержимого рубца жвачных следующие виды: Ruminococcus flavefaciens, R. albus, Butyrivibrio fibrisolvens, Cillobacterium cellulosolvens (7, 11). Последний вид выделяется из рубца довольно редко, следует отметить, что ни в смешанных культурах, ни в чистом виде представители вида Bacteroides succinogenes не были обнаружены. Возможно, отсутствие микроорганизмов данного вида в преджелудках обследованных животных было обусловлено недостатком в кормах кобальта, поскольку известно, что при недостаточном содержании в рационе этого элемента палочковидные целлюлозолитические бактерии в рубце замещаются руминококками (85).

4.4.3. Определение численности целлюлозолитических бактерий в содержимом рубца

Для определения количества целлюлозолитических микроорганизмов в преджелудках предложено несколько методов. Зарубежные исследователи использовали для этих целей посев на плотные питательные среды с целлюлозой и последующим подсчетом выросших колоний. Этот культуральный метод весьма трудоемок и нашел ограниченное применение.

Другим, хотя и менее точным, но широко используемым методом, является метод предельных разведений. При его применении можно использовать приведенную выше среду Хангейта, единственным источником углеводов в которой является фильтровальная бумага. Разведения рубцового содержимого от 10^{-1} до 10^{-10} готовят прямо в культуральной среде. После этого каждую пробирку насыщают в течение одной минуты углекислым газом и закрывают резиновой пробкой. Инкубацию проводят при 39^0С в течение месяца. Результаты учитывают в первые 10 дней - ежедневно, а затем на 20 и 30-е сутки. О количестве целлюлозолитических бактерий судят по предельному разведению, в котором визуально наблюдается разрушение полоски фильтровальной бумаги. Следует иметь в виду, что культуральные методы, в том числе и метод предельных разведений, не дают достаточно полного представления о количестве целлюлозолитических микроорганизмов в рубце. Поэтому при необходимости более точного определения числа бактерий данной группы в рубцовом содержимом может быть использован оригинальный иммунохимический метод, разработанный в нашей лаборатории применительно к руминококкам Горевой (5).

4.4.4. Методы определения активности целлюлаз

Изучение механизма ферментативного гидролиза целлюлозосодержащих субстратов в значительной степени затруднено ввиду перекрывающейся субстратной специфичности компонентов целлюлазных комплексов, что приводит к образованию продуктов (глюкоза, целлобио-

за, реже - целлотриоза) при действии на целлюлозу как индивидуальных целлюлаз, так и сложных мультиэнзимных композиций. Поэтому вопросам определения активности целлюлаз постоянно уделяется большое внимание, продолжается поиск новых общих и селективных методов их детекции. В данном разделе мы рассмотрим методы определения общей целлюлазной активности и активности некоторых отдельных ферментов целлюлазного комплекса.

Важно отметить, что при определении активности целлюлаз практически не существует общепринятых, стандартных по условиям и способу расчета активности методик. Поэтому, прежде чем приступить к описанию конкретных методик определения активности целлюлозолитических ферментов, необходимо остановиться на способах расчета активности. Как правило, активность выражают в единицах на грамм (миллиграмм) ферментного препарата или миллилитр (содержимого рубца, культуральной жидкости), и 1 единица активности соответствует 1 микромолю гидролизуемого субстрата или образуемого продукта за 1 мин реакции.

Существует два основных способа определения и расчета активности. Один из них заключается в том, что при инкубации исследуемого материала с субстратом отбирается через определенное время реакции одна проба, в которой определяется содержание глюкозы, восстанавливающих (редуцирующих) сахаров или других продуктов. В этом случае удельная активность (ед/г, ед/мг или ед/мл) рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{\Delta[P]}{t \cdot [E]},$$

где: t - время реакции (мин); $\Delta[P]$ - количество продукта (мкмоль/л), выделившееся за время t; [E] - концентрация фермента (количество содержимого рубца или культуральной жидкости) в реакционной смеси, используемой для определения активности (г/л, мг/л, или мл/л). Поскольку сам по себе исследуемый материал может содержать сахара (фон), величину $\Delta[P]$ обычно находят по разности между содержанием продукта в анализируемой пробе и контрольной (нулевой) пробе.

Другой метод определения и расчета активности заключается в том, что в ходе реакции отбирают несколько проб, в которых анализируют содержание продукта. На основании полученных данных строят график в координатах ($[P]_t$; t), из которого определяют начальную скорость образования продукта как тангенс угла наклона касательной к начальному участку кинетической кривой: $tg\alpha = d[P] / dt$ (см. рис.). В данном случае также ставят контрольную (нулевую) пробу, в которой определяют фоновое содержание продукта. На рисунке отсекаемый на оси ординат отрезок соответствует концентрации продукта в контрольной среде $[P]_0$.

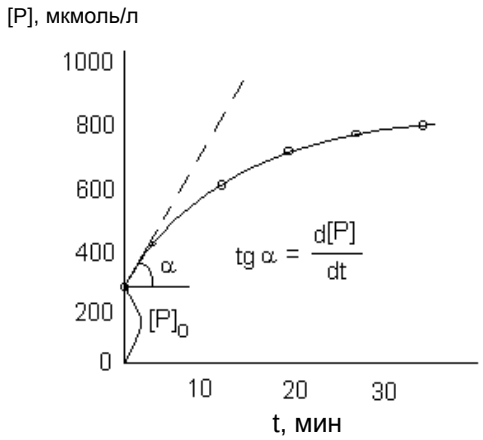


Рис. Определение начальной скорости образования продуктов при определении ферментативной активности на основании кинетических данных.

Формула для расчета активности имеет следующий вид:

$$A = \frac{d[P]}{dt \cdot [E]} = \frac{tg\alpha}{[E]},$$

где размерности параметров такие же, как и в приведенной выше формуле.

В представленных ниже методиках используются оба способа расчета активности. В ряде случаев активность рассчитывают другими способами и при этом приводятся свои формулы для расчета.

4.4.4.1. Определение целлюлозолитической активности смешанной микрофлоры преджелудков по методу Хендерсона, Хорвата и Блока в модификации Чюрлиса (13)

Метод основан на определении разницы в весе целлюлозы (фильтровальной бумаги, целлофана, беззольных фильтров или других источников) до и после инкубации ее с содержимым рубца в условиях in vitro.

Для определения целлюлозолитической активности используют стеклянные пробирки диаметром 18 - 19 мм и длиной 180 мм, оборудованные резиновыми пробками с дефлегматорами. В день опыта в пробирки помещают высушенные до постоянного веса при 104 - 106°С обеззоленные фильтры, среди которых хорошо зарекомендовали себя фильтры немецкого производства № 390 (диаметр 9 см и вес в пределах 485 - 500 мг).

Хорошим источником целлюлозы являются беззольные фильтры, производимые в нашей стране заводом «Чистые соли», но они после 24-часовой инкубации довольно сильно разрушаются и их трудно отмывать.

Доставленное в лабораторию содержимое рубца фильтруют через 2 слоя марли и вносят по 10 мл в пробирки с фильтром. Из каждой пробы посев производят не менее чем в трех повторностях. Затем в пробирки с рубцовым содержимым и источником целлюлозы добавляют по 10 мл подогретой до 39°С стерильной питательной среды следующего состава (мг/л): NaH_2PO_4 - 2041,6; $NaHCO_3$ - 2041,6; KCl - 262,4; KJ - 28,03; NaCl - 262,4; $MgSO_4$ - 8,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 31,2; $MnSO_4$ - 15,6; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 1,6; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,47; $CoSO_4$ - 0,7; $Na_2P_4O_7 \cdot 10H_2O$ - 0,07; $CrCl_2 \cdot 5H_2O$ - 0,16; K_2CrO_4 - 0,08; $NaAsO_3$ - 0,13; глюкоза - 500; мочевина - 840; и дистиллированная вода - 1 л. Полученную смесь насыщают в течение 10 - 15 сек углекислым газом и закрывают резиновой пробкой с дефлегматором, заполненным дистиллированной водой. Назначение заполненного дефлегматора состоит в том, что он позволяет отходить из пробирки образующимся в процессе брожения газам и предотвращает поступление в пробирку наружного воздуха.

Следует однако отметить, что питательная среда, рекомендованная Чюрлисом (13), не содержит органических азотистых соединений и включает глюкозу, что отрицательно сказывается на росте и размножении некоторых целлюлозолитических бактерий. Для обеспечения развития всех видов целлюлозолитиков Долговым из среды Чюрлиса была исключена глюкоза и введены цистеин солянокислый, дрожжевой экстракт и пептон в количестве 500 мг, 1 г и 5 г на 1 л среды соответственно (8).

Инкубацию посевов осуществляют в течение 24 ч в термостате при температуре 39^0С. Одновременно в аналогичных условиях инкубируют контрольные пробирки, в которых источник целлюлозы залит только питательной средой. Контроль ставится для того, чтобы проверить, не растворяется ли используемая в опытах целлюлоза в жидкой питательной среде. В положительных случаях необходимо вводить в расчеты соответствующие поправки.

После 24-часовой инкубации бумажные фильтры с помощью пинцета извлекают из пробирок и промывают в проточной дистиллированной воде. Эта операция требует особого внимания тогда, когда бумага сильно деструктирована и для предотвращения ее потерь в процессе отмывания необходимо подавать равномерную и несильную струю воды. Промытые бумажные фильтры помещают в бюксы и высушивают до постоянного веса. Величина потери веса целлюлозы показывает активность целлюлозолитической микрофлоры рубца, которую выражают в процентах и рассчитывают по формуле:

% расщепленной целлюлозы $= (S_0 - S_1) \cdot 100/S_0$,

где S_0 - количество внесенной в среду целлюлозы, S_1 - количество целлюлозы, оставшейся после ферментации.

Скорость расщепления целлюлозы рассчитывают по формуле:

Скорость расщепления, мг/ч $= S_0 - S_1/t_1 - t_0$,

где S_0 и S_1 - содержание целлюлозы в культуральной пробирке в моменты времени t_0 и t_1.

4.4.4.2. Определение целлюлазной активности по фильтровальной бумаге

Метод основан на определении восстанавливающих сахаров (ВС), образующихся при действии целлюлазного комплекса на хроматографическую бумагу "Ватман № 1" (86, 87). Этот метод рекомендован международной Комиссией ИЮПАК по биотехнологии в качестве основного стандартного теста на целлюлазную активность (86). Необходимо отметить, что в данном методе активность рассчитывают по количеству фермента, которое образует ровно 2 мг восстанавливающих сахаров (в глюкозных эквивалентах) из 50 мг фильтровальной бумаги за 1 ч гидролиза. Поэтому реакцию гидролиза проводят, как минимум, при двух разбавлениях исследуемого материала (рубцового содержимого или культуральной жидкости). При этом в одном случае фермент должен образовывать несколько меньше 2 мг, а в другом - несколько больше 2 мг сахаров. Далее по данным двух измерений графически находят количество фермента, которое образует точно 2 мг восстанавливающих сахаров.

За единицу активности целлюлазы принимают такое количество фермента, которое при действии на хроматографическую бумагу при 50°С и pH 4,8 образует 1 мкмоль восстанавливающих сахаров в 1 мин. Как правило, активность выражается в единицах на миллилитр.

Определение. Полоски хроматографической бумаги, весом 50 мг каждая (1×6 см), помещают в две стеклянные пробирки емкостью 25 - 30 мл и добавляют по 1 мл 0,05 М цитратного буфера (pH 4,8). Пробирки инкубируют в течение 5 - 10 мин в термостатируемом при 50°С сосуде, после чего добавляют по 0,5 мл подогретых до 50^0С растворов рубцового содержимого различного разбавления и отмечают по секундомеру время начала реакции. Разбавления подбирают таким образом, чтобы в одной из пробирок через 1 ч реакции образовалось несколько меньше 2 мг, а в другой - несколько больше 2 мг восстанавливающих сахаров. Пробирки инкубируют при 50^0С в течение 1 ч, после чего быстро добавляют 3 мл динитросалицилового реагента, кипятят в течение 5 мин на водяной бане, охлаждают, добавляют 20 мл дистиллированной воды и анализируют на содержание восстанавливающих сахаров (86, 87). Поскольку содержимое рубца может содержать сахара, предварительно также готовят нулевые пробы исследуемого материала аналогично опытным, но без фильтровальной бумаги (к 1 мл цитратного буфера добавляют по 0,5 мл раствора рубцового содержимого, 3 мл динитросалицилового реагента, смесь кипятят 5 мин, охлаждают, добавляют 20 мл воды и определяют оптическую плотность). Определение оптической плотности при 540 нм во всех случаях проводят против контрольной пробы (оптический ноль), приготовленной путем добавления 3 мл реагента к 1,5 мл 0,05М цитратного буфера (pH 4,8) и обработанной аналогично опытным пробам.

Расчет активности. По калибровочному графику находят концентрацию (мг/мл) и общее количество (мг) восстанавливающих сахаров в

пробах и, вычитая фоновое содержание сахаров в растворе рубцовой жидкости, для каждого разведения рубцового содержимого рассчитывают количество выделившихся из фильтровальной бумаги сахаров. Необходимо обратить внимание, что в итоговых расчетах используют не концентрацию (мг/мл), а весовое количество (мг) сахаров. По данным двух измерений графически находят концентрацию фермента, при которой за 1 ч гидролиза выделяется точно 2 мг восстанавливающих сахаров.

Концентрация фермента выражается в безразмерных единицах (мл/мл) как величина, обратная разбавлению:

$$[E] = \frac{1}{\text{разбавление}} = \frac{\text{объем исследуемого материала, взятый для разбавления}}{\text{конечный объем разбавленного раствора}}$$

Необходимо отметить, что дополнительное разбавление за счет смешивания 0,5 мл раствора исследуемого материала с 1 мл цитратного буфера учитывать не следует, поскольку оно учитывается в коэффициенте, входящем в конечную формулу для расчета активности.

Целлюлазную активность по фильтровальной бумаге рассчитывают по формуле:

A (ед/мл) = 0,37 / [E],

где [E] концентрация фермента, при которой из фильтровальной бумаги за 1 ч образуется 2 мг восстанавливающих сахаров.

4.4.4.3. Определение активности целлюлазного комплекса по аморфной целлюлозе или авицелу (авицелазная активность)

За единицу авицелазной активности принимается начальная скорость гидролиза нерастворимого субстрата (концентрация 5 г/л), равная 1 мкмолю образующихся ВС в минуту в pH-оптимуме активности фермента при 40^0C (86). Для характеристики исследуемого материала используют удельную активность, т.е. активность рассчитанную на 1 г материала.

Определение. 50 мг субстрата (микрокристаллическая целлюлоза, регенерированная из кадоксена или фосфорной кислоты целлюлоза) помещают в пробирку с притертой пробкой, добавляют 5 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,5, опускают в пробирку магнитную мешалку и прогревают 5 - 10 мин при перемешивании в термостатированной ячейке при 40°C. После этого вносят подогретую до такой же температуры рубцовую или культуральную жидкость в количестве 0,1 - 5 мл (в зависимости от активности). Общий объем реакционной смеси должен составлять 10 мл. Поэтому, если для определения используют меньше 5 мл исследуемого материала, то перед его добавлением вносят соответст-

вующий объем прогретого до той же температуры ацетатного буфера. Реакционную смесь перемешивают и отмечают время реакции по секундомеру. Через равные промежутки времени (5 - 20 мин) отбирают пробы, отделяют их от субстрата фильтрацией или центрифугированием и определяют в них содержание ВС по Сомоджи-Нельсону (98). Для корректного определения активности требуется отобрать 5 - 6 проб. Концентрацию фермента (исследуемого материала) и время отбора проб подбирают таким образом, чтобы концентрация ВС в последних пробах не превышала 2 - 3 мМ. Если это условие не выполняется, то исследуемый материал разбавляют.

Необходимо учитывать, что содержимое рубца обычно содержит ВС (фон). Поэтому перед определением активности необходимо проанализировать рубцовое содержимое на наличие ВС и вычитать это значение из результатов анализа последующих проб.

Результаты анализов в пробах наносят на график в координатах ($[ВС]_t$; t), где $[ВС]_t$ - концентрация ВС в момент реакции t (мин). По точкам строят кинетическую кривую и рассчитывают активность как тангенс угла наклона касательной к начальному участку этой кривой (см. выше).

Регенерированная целлюлоза может быть приготовлена из хроматографической бумаги. Для этого к 5 г измельченной бумаги добавляют 100 мл концентрированной фосфорной кислоты. Взвесь 5 мин нагревают в кипящей водяной бане, после чего прозрачный раствор декантируют в 2 л охлажденной до 4^0С дистиллированной воды и оставляют для осаждения целлюлозы на несколько часов при 4^0С. Осадок отделяют центрифугированием и переносят в 270 мл 0,07 М фосфатного буфера pH 7,0. При необходимости высушивают.

4.4.4.4. Определение карбоксиметилцеллюлазной (КМЦ-азной) активности (10).

За единицу активности принимают начальную скорость гидролиза КМЦ (концентрация 10 г/л), равную 1 мкмолю образующихся ВС в минуту в pH-оптимуме активности фермента при 40^0С. Для характеристики исследуемого образца используют удельную активность, т.е. активность, рассчитанную на 1 мл содержимого рубца.

Определение. 4 мл раствора КМЦ (15 г/л) в 0,1 М ацетатном буфере (pH 4,5) помещают в пробирку с пробкой, прогревают 5 мин и вносят подогретое до такой же температуры содержимое рубца в количестве 0,02 - 2 мл (в зависимости от активности). Общий объем реакционной смеси должен составлять 6 мл. Поэтому, если для определения используют меньше 2 мл содержимого рубца, то перед его добавлением вносят соответствующий объем ацетатного буфера. Реакционную смесь быстро перемешивают и отмечают время реакции по секундомеру. Через равные промежутки времени (30 с - 5 мин или более) отбирают пробы и определяют в них содержание ВС по Сомоджи-Нельсону (9,10,98).

При выпадении КМЦ в осадок после добавления реактива Нельсона перед доведением объема до 10 мл приливают 0,5 - 1 мл ацетона.

Для корректного определения активности требуется отобрать 5 - 6 проб. Концентрацию ферментного комплекса в рубцовом содержимом и время отбора проб следует подбирать таким образом, чтобы концентрация ВС в последних пробах не превышала 1 мМ. Если это условие не выполняется, то исследуемый материал следует разбавить.

Поскольку содержимое рубца обычно содержит ВС, перед определением активности в нем устанавливают наличие ВС и вычитают это значение из результатов анализа последующих проб.

Результаты анализов наносят на график в координатах ($[BC]_t$; t), где $[BC]_t$ - концентрация ВС в момент реакции t(мин). По точкам проводят кинетическую кривую и рассчитывают активность как тангенс угла наклона касательной к начальному участку этой кривой (см. рис. в разделе 4.4.4.). Следует иметь ввиду, что процесс образования ВС из КМЦ характеризуется, как правило, "выбросом" ВС в начальный момент реакции.

4.4.4.5. Определение экзоглюкозидазной активности целлюлазного комплекса (10, 86)

Под экзоглюкозидазной активностью подразумевается активность всех компонентов целлюлазного комплекса, образующих глюкозу при гидролизе КМЦ, за исключением целлобиазы. За единицу экзоглюкозидазной активности содержимого рубца принимается начальная скорость образования глюкозы из КМЦ (10 г/л), выраженная в мкмолях в минуту в pH-оптимуме действия комплекса при 40^0C. Для характеристики рубцовой или культуральной жидкости используют удельную активность, рассчитанную на 1 мл.

Определение активности проводят подобно анализу КМЦ-азной активности, регистрируя кинетику накопления глюкозы в реакционной смеси с использованием глюкозооксидазно-пероксидазного метода (4). Если целлюлазный комплекс содержит целлобиазу (β - глюкозидазу), в реакционную смесь добавляют селективный ингибитор данного фермента -δ-глюконолактон. При этом концентрацию глюконолактона подбирают таким образом, чтобы целлобиазная активность полностью подавлялась. Для этого в предварительных экспериментах с содержимым рубца проводят гидролиз целлобиозы (2×10^{-3}М) при различных концентрациях глюконолактона. Обычно если целлобиазная активность лежит в пределах 1 - 100 ед/г, а концентрация ферментного комплекса в реакционной смеси находится в пределах 0,1 - 1 г/л, полное ингибирование целлобиазной активности достигается при концентрации ингибитора 5 - 10 мМ.

Расчет экзоглюкозидазной активности осуществляют аналогично КМЦ-азной активности. Следует иметь ввиду, что образование глюкозы из КМЦ происходит, как правило, с периодом индукции.

Что касается методов определения активностей индивидуальных компонентов целлюлазного комплекса (эндоглюканазы, целлобиогидролазы, β-глюкозидазы), то применительно к содержимому рубца они еще

недостаточно адаптированы. В случае изучения чистых культур целлюлозолитических бактерий могут быть использованы подходы и методы, изложенные в обзоре Синицына с соавт. (12).

Поскольку исследование активности ферментного комплекса целлюлозолитических микроорганизмов базируется на образовании восстанавливающих сахаров, представляется целесообразным рассмотреть в этом разделе и методы их определения.

4.4.5. Методы определения восстанавливающих сахаров (12).

Существует много методов определения содержания сахаров. Большинство из них позволяют определять концентрацию таких сахаров, в химической структуре которых имеется функциональная альдегидная группа (восстанавливающая группа), способная окисляться в присутствии различных химических соединений, давая при этом характерную хромогенную реакцию.

Поскольку в результате ферментативного гидролиза целлюлозы образуются сахара, содержащие концевые восстанавливающие группы, именно на анализе выделяющихся в ходе ферментативной реакции восстанавливающих сахаров основано большинства методов определения активности целлюлозолитических ферментов. Наибольшее распространение получили такие методы, как Сомоджи-Нельсона, динитросалициловый, феррицианидный. Следует, однако, учитывать, что поскольку в результате ферментативного гидролиза целлюлозы помимо глюкозы могут образовываться целлобиоза и другие олигосахариды, содержащие на одну молекулу вне зависимости от ее длины одну восстанавливающую группу, перечисленные методы не позволяют найти истинную (весовую) концентрацию сахаров, а дают возможность оценить только содержание концевых восстанавливающих групп сахаров в растворе. При этом концентрация сахаров, как правило, выражается в глюкозных эквивалентах.

Существует так же ряд методов определения концентрации сахаров, в ходе которых олигосахариды подвергаются кислотному гидролизу с образованием мономеров и в результате этого в растворе фактически определяется содержание мономерных глюкозных звеньев. Эти методы позволяют найти истинную массовую (весовую) концентрацию сахаров и описание одного из таких методов (фенолсернокислого) представлено в данном разделе.

4.4.5.1. Определение сахаров по методу Сомоджи-Нельсона (9, 10, 86, 98)

Принцип метода Сомоджи-Нельсона состоит в первоначальном количественном окислении восстанавливающих сахаров, образующихся при ферментативном гидролизе целлюлозы, реактивом Сомоджи в щелочной среде (pH 9) с образованием закиси меди и последующим окислением арсеномолибдатным реактивом Нельсона в кислой среде (pH

1,7 - 2,0) с образованием молибденовой сини, окраска которой устойчива в течение 24 - 36 ч.

При постановке анализа по данному методу используют реактив Сомоджи и реактив Нельсона.

Реактив Сомоджи состоит из двух растворов. Раствор А: 24 г безводного Na_2CO_3 и 12 г виннокислого калия-натрия растворяют в 250 мл дистиллированной воды. К полученному раствору добавляют при перемешивании раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (4 г в 40 мл воды) и далее - 16 г $NaHCO_3$. Раствор Б: 180 г Na_2SO_4 растворяют в 500 мл горячей (80^0C) воды и кипятят в течение 5 мин.

Раствор А смешивают с раствором Б, доводят до 1000 мл дистиллированной водой и полученный реактив Сомоджи голубого цвета сохраняют в темной посуде 2 - 3 мес.

Реактив Нельсона готовят следующим образом: 25 г молибдата аммония растворяют в 450 мл горячей (60^0C) дистиллированной воды. Раствор охлаждают до 5 - 10^0C и добавляют 21 мл концентрированной серной кислоты, содержащей 3 г арсената натрия. Объем раствора доводят до 500 мл. Смесь инкубируют при 40^0C в течение 24 - 48 ч и затем, в случае необходимости, фильтруют. Срок хранения реактива 2 - 3 мес.

Постановка реакции. В градуированную пробирку объемом 15 - 20мл вносят 1 мл реактива Сомоджи и 1 мл исследуемого материала. Пробирку помещают на 40 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждают и добавляют 1 мл реактива Нельсона. Пробирку встряхивают и доводят объем жидкости водой до 10 мл. Определяют оптическую плотность полученного раствора в 1-см кювете при длине волны 610 нм, используя в качестве сравнения раствор, приготовленный таким же путем, но с дистиллированной водой вместо пробы. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяют с помощью калибровочного графика по глюкозе в качестве стандарта. Калибровочный график имеет линейный вид в диапазоне концентраций глюкозы 1×10^{-4} - 1×10^{-3} М (20-180 мкг/мл).

4.4.5.2. Динитросалициловый метод определения сахаров (86, 87)

Для определения восстанавливающих сахаров динитросалициловым методом готовят следующий реагент: в 1416 мл дистиллированной воды растворяют 10,6 г 3,5-динитросалициловой кислоты и 19,8 г NaOH. Далее к полученному раствору добавляют 306 г тартрата калия-натрия, 7,6 мл расплавленного фенола и 8,3 г $NaHCO_3$; 3 мл раствора титруют с фенолфталеином 0,1 н HCl. На титрование должно затрачиваться 5 - 6 мл кислоты. В случае необходимости к реагенту дополнительно добавляют NaOH (на каждые 2 г щелочи при титровании расходуется примерно 1 мл 0,1 н HCl). Полученный динитросалициловый реагент закрывают плотно притертой пробкой (для уменьшения доступа воздуха) и хранят в темноте в течение нескольких месяцев.

Для определения восстанавливающих сахаров 1,5 мл исследуемого материала помещают в градуированную пробирку объемом 25 - 30 мл

и добавляют 3 мл динитросалицилового реагента. Смесь кипятят 5 мин на водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 20 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и определяют оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм относительно кюветы сравнения, содержащей буфер, обработанный динитросалициловым реагентом таким же образам. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяют по калибровочному графику, используя в качестве стандарта глюкозу. График имеет линейный вид для концентраций глюкозы 1×10^{-3} - 2×10^{-2} М (0,2 - 3,5 мг/мл).

4.4.5.3. Феррицианидный метод определения сахаров (86)

Для приготовления феррицианидного реактива растворяют 6 г углекислого натрия в 200 мл дистиллированной воды и переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл. Добавляют 0,6 г феррицианида калия (красная кровяная соль), после растворения которого объем раствора доводят до 1000 мл. Раствор хранят при комнатной температуре в темной склянке в течение нескольких месяцев.

Для определения восстанавливающих сахаров в пробирку вносят 1 мл анализируемого раствора и добавляют 3 мл феррицианидного реактива. Смесь кипятят на водяной бане в течение 10 мин, охлаждают и измеряют интенсивность окраски при длине волны 400 нм относительно дистиллированной воды. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяют по калибровочному графику, используя в качестве стандарта глюкозу. График имеет линейный вид в диапазоне концентраций глюкозы 1×10^{-4} - 8×10^{-4} М (20 - 150 мкг/мл). Следует отметить, что в данном методе, в отличие от других, график имеет отрицательный наклон, т.е., интенсивность окраски убывает с увеличением концентрации сахаров.

4.4.5.4. Фенолсернокислый метод определения сахаров (9, 84, 86)

При определении сахаров фенолсернокислым методом используют следующие реактивы.

1. Серная кислота (95 - 96%, d=1,84).

2. Фенол (80%) готовят добавлением 20 г дистиллированной воды к 80 г предварительно перегнанного фенола. Раствор можно использовать в течение нескольких месяцев. Соответствующим разбавлением дистиллированной водой готовят 5% - ный фенол.

В пробирку вносят 1 мл раствора, содержащего 10 - 80 мкг сахаров, добавляют 1 мл 5%-ного фенола и 5 мл концентрированной (95 - 96%) серной кислоты. Смесь тщательно перемешивают и охлаждают при комнатной температуре в течение 20 - 30 мин. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 490 нм относительно контроля, в котором вместо раствора сахаров берут дистиллированную воду. Количество сахаров определяют по калибровочному графику, который имеет линейный вид в диапазоне концентраций сахаров 10 - 80

мкг/мл. Желто-оранжевая окраска раствора стабильна в течение нескольких часов.

Данный метод позволяет определить истинную концентрацию сахаров (мономерных звеньев) в растворе, поскольку в ходе определения участвующая в реакции серная кислота обеспечивает гидролиз олигосахаридов до мономеров, которые в свою очередь при взаимодействии с фенолом дают характерную окраску.

4.4.6. Исследование анаэробных целлюлозолитических грибов пищеварительного тракта жвачных

Для оценки состояния анаэробной микофлоры в преджелудках жвачных используют такие показатели, как концентрация зооспор в рубцовой жидкости и интенсивность колонизации различных субстратов в нейлоновых мешочках в рубце.

4.4.6.1. Определение концентрации зооспор в содержимом рубца

Для определения концентрации зооспор через фистулу рубца берут содержимое, фильтруют его через 2 слоя марли и смешивают (1:1) с 2%-ным (вес:объем) раствором формальдегида. Зооспоры подсчитывают в гемоцитометрической камере Горяева при помощи фазово-контрастной микроскопии (×200). От жгутиковых простейших их дифференцируют по характерной морфологии и размерам (91, 100), а их родовую принадлежность устанавливают по описаниям, представленным в работах Орпина (93, 94, 95).

4.4.6.2. Исследование колонизации субстратов анаэробными грибами in situ

Интенсивность колонизации субстрата анаэробными грибами определяют путем инкубации в рубце различных растительных субстратов (сено, солома, жмыхи и т.п.). В своих экспериментах мы использовали тимофеечное сено. Листовые пластинки нарезали кусочками по 15 - 20 мм длиной и помещали в нейлоновые мешочки с размером пор от 50 до 170 мкм. Мешочки привязывали к капроновому шнуру длиной 50 см и через фистулу вводили в рубец непосредственно перед кормлением животного. Инкубацию вели в течение 16 ч, после чего мешочки извлекали и промывали водопроводной водой. Кусочки листьев помещали на предметное стекло, слегка отжимали фильтровальной бумагой и окрашивали в течение 50 сек лактофеноловым синим (80), который модифицировали введением метилового синего вместо трипановой сини. Краситель имел следующий состав: фенол - 10 г, глицерин - 10 мл, 40%-ный (вес:объем) водный раствор молочной кислоты - 10 мл, дистиллированная вода - 10 мл и метиловый синий - 30 мг. Интенсивность колонизации субстрата определяли на 5 кусочках листьев от каждого животного. В 5-ти произвольно выбранных точках листовой пластинки под

микроскопом (×150) подсчитывали количество спорангиев в площади окулярной сетки. Хитиновые вещества окрашивали по методу, предложенному для индикации эктопаразитов рыб (96).

4.4.6.3. Первичное выделение анаэробных целлюлозолитических грибов

Для выделения анаэробных грибов из рубца жвачных обычно используют питательные среды для целлюлозолитических бактерий рубца, но с добавлением антибиотиков. Чистые культуры получают клонированием одной зооспоры или таллома, отобранных при помощи микроманипулятора (82) и выделением изолированной колонии с агаризованных сред (92). Мы пользовались методом Джоблина (90), который представляется нам самым простым из перечисленных.

Пробы содержимого рубца целесообразно брать через 30 - 60 мин после кормления животного, так как именно в это время концентрация зооспор анаэробных грибов в рубце достигает максимума. Обычно мы отбирали через фистулу 50 - 100 мл содержимого, фильтровали его через 2 слоя марли, после чего фильтрат высевали на питательную среду. Нам удавалось выделять культуры анаэробных грибов из профильтрованной рубцовой жидкости, которая хранилась в открытом флаконе при комнатной температуре до 8 ч.

Для выделения анаэробных хитридиомицетов рубца использовали среду, предложенную Баушоп (81). Среда состояла из 880 мл основного раствора, 100 мл 5%-ного раствора соды, 10 мл 5%-ного раствора K_2HPO_4 и 10 мл раствора восстановителей. Основной раствор имел следующий состав: $(NH_4)_2SO_4$ - 0,5 г; KH_2PO_4 - 0,5 г; NaCl - 1,0 г; $MgS0_4 \cdot 7H_2O$ - 0,05 г; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0,05 г; пептон - 1,0 г; дрожжевой экстракт - 1,0 г; осветленная рубцовая жидкость - 150 мл; дистиллированной воды 730 мл. Раствор восстановителей состоял из 20 г/л солянокислого цистеина и 10 г/л $Na_2S \cdot 9H_2O$. Для приготовления осветленной рубцовой жидкости брали содержимое через 1 - 2 ч после кормления животных. Фильтровали его через 4 слоя марли и центрифугировали при 15000 g в течение 1 ч при 4^0C.

В пробирки помещали приблизительно по 50 мг молотой пшеничной соломы или полоски фильтровальной бумаги (50×5 мм). Основной раствор доводили до кипения, разливали по 9,2 мл в пробирки, через которые непрерывно продували CO_2 и закупоривали их пробками из бутиловой резины (Bellco Glass Inc.) Восстановители, соду и KH_2PO_4 отвешивали в чистую сухую посуду и при продувании углекислого газа доводили до нужного объема прокипяченной дистиллированной водой. Все растворы автоклавировали при 0,5 атм в течение 30 мин, после чего в каждую пробирку добавляли стерильным шприцом через пробку растворы соды, фосфата и восстановителей по 0,5, 0,1 и 0,1 мл соответственно.

Непосредственно перед инокуляцией в каждую пробирку добавляли по 0,1 мл раствора натриевой соли бензилпенициллина (5×10^7 МЕ/л)

и сульфата стрептомицина (5 г/л). Раствор антибиотиков готовили на стерильной воде из стерильных фармацевтических препаратов. Среды не рекомендуется хранить дольше 1 недели. Нежелательно также хранить их в холодильнике, так как при пониженных температурах увеличивается растворимость кислорода в воде.

В каждую пробирку со средой через пробку стерильным шприцом вводили 0,5 мл профильтрованной рубцовой жидкости и ставили на инкубацию при 39^0С. Через 3 - 4 суток под микроскопом в раздавленной капле культуры видны зооспоры и талломы грибов. Если в качестве источника углерода использовали фильтровальную бумагу, то на ее поверхности отчетливо были видны круглые зоны лизиса диаметром до 2 - 3 мм. Иногда на бумаге образуются характерные вздутия и полоска всплывает к поверхности среды, что вызвано накоплением газа между волокнами бумаги в процессе роста грибного мицелия.

Чистые культуры выделяли методом ролл-тьюб (89) на среде, состав которой приведен выше, с добавлением 2% агара и 0,2% целлобиозы. Агар добавляли в основной раствор перед кипячением последнего. Разливали раствор в пробирки по 4 мл при непрерывном продувании CO_2, закупоривали, автоклавировали при 1 атм. в течение 30 мин, после чего ставили горячими в водяную баню при 45°С. Остальные растворы готовили как описано выше и добавляли в расплавленный агар после стерилизации: по 0,5 мл раствора соды и по 0,1 мл - K_2HPO_4, целлобиозы и антибиотиков. В качестве инокулума использовали 0,5 мл культуры, в которой под микроскопом перед посевом обнаруживали активно движущиеся зооспоры. Пробирки охлаждали быстрым вращением в воде при комнатной температуре и после затвердевания агара ставили в термостат при температуре 39^0С. Уже через 3 ч под микроскопом видны проросшие зооспоры, а в среднем через сутки в агаре появляются мелкие колонии, которые различимы даже невооруженным глазом. Под микроскопом видна гроздь спорангиев в центре колонии, от которой радиально расходятся гифы. Отдельную колонию накалывали пастеровской пипеткой, имеющей загнутый кончик длиной 3 - 5 мм, и выдували агаровый столбик в пробирку со свежей питательной средой с пшеничной соломой. Продувание газа через обе пробирки при этом обязательно. Через 2 - 3 суток в пробирках наблюдается рост. Из активно растущих культур снова проводили посев на ролл-тьюб и всю процедуру повторяли еще 2 - 3 раза, всякий раз исследуя под микроскопом морфологию выделяемых организмов. Чистоту культур проверяли высевом на жидкую среду с глюкозой, в которую не включали антибиотики. В случае загрязнения бактериями среда мутнеет через несколько часов, в то время как в чистых культурах мицелий растет на стенках пробирки, а среда остается прозрачной.

4.4.6.4. Поддержание чистых культур анаэробных целлюлозолитических грибов в коллекции

Полученные чистые культуры пересевали каждые 2 - 4 дня, так как позже этого срока они погибают. Пересев лучше всего вести в одно и то же время суток, поскольку продолжительность жизненного цикла хитридиомицетов рубца варьирует в пределах 24 - 28 ч. Перед пересевом необходимо проверять культуры под микроскопом на наличие подвижных зооспор и отбирать для посева те культуры, в которых обнаруживается большое количество активно двигающихся спор. При этом объем инокулума может не превышать 5% от объема среды.

В дальнейшем мы вели культивирование грибов на полусинтетической среде, в которую вместо рубцовой жидкости вводили 10 мл раствора летучих жирных кислот, 10 мл раствора витаминов, 10 мл раствора микроэлементов и 10 мл раствора гемина. Раствор ЛЖК содержал в 1 л 10 г ацетата натрия, 3 г пропионата натрия, 560 мг изобутирата натрия, 2,2 г бутирата натрия и по 620 мг изовалериата и валериата натрия. 1 л раствора витаминов включал 500 мг D - биотина, 500 мг тиамина гидрохлорида и по 200 мг ниацина и солянокислого пиридоксина. В 100мл раствора микроэлементов содержалось 140 мг $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 250 мг $FeS0_4 \cdot 7H_2O$; 220 мг $MnS0_4 \cdot 5H_2O$, 220 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 10 мг H_3BO_4;15 мг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 1,5 мг Na_2SeO_3; 3,8 мг $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$; 1,2 мг NH_4VO_3; 1,5 мг KJ; 4 мг $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 4 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,8 мг $LiS0_4$; 0,4 мг $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ и 0,9 мг $AlCl_3 \cdot 6H_2O$. Данный раствор был предложен для культивирования целлюлозолитических микромицетов А.В. Шульгой (неопубликованные данные).

Раствор гемина готовили добавлением 100 мг гемина (Serva) в 100 мл раствора, состоящего из 50 мл этанола и 50 мл 0,05 М NaOH. Растворы микроэлементов и ЛЖК вводили в основной раствор до стерилизации. Растворы гемина и витаминов стерилизовали отдельно автоклавированием и фильтрованием соответственно и вводили шприцом в каждую пробирку. Так как раствор гемина имел pH выше 7, его готовили при продувании азота. То же рекомендуется и при приготовлении других растворов, имеющих щелочной pH. Объем основного раствора до добавления ЛЖК и микроэлементов составлял 860 мл. Грибы рубца хорошо растут на полностью синтетической среде без пептона и дрожжевого экстракта, а также на коммерческой среде «Yeast Nitrogen Base w/o amino acid» (Difco), источником азота в которой служит $(NH_4)_2SO_4$ (5 г/л среды). Для культивирования анаэробных грибов мы модифицировали среду добавлением по 10 мл/л среды растворов ЛЖК и гемина, а также 0,5 г/л KH_2PO_4 и 5 г/л $NaHCO_3$.

В качестве источника углерода и энергии в средах используются как нерастворимые субстраты (солома, бумага), так и растворимые (глюкоза, целлобиоза). В последнем случае зооспоры прикрепляются к стеклу пробирки, где прорастают с последующим образованием таллома. Под микроскопом при малом увеличении можно проследить весь жизненный цикл грибов рубца от прикрепления первичной зооспоры до

высвобождения новой генерации. С этой целью удобно использовать молочные или сливочные жиромеры, тем более, что диаметр их горлышка соответствует размеру бутиловых пробок. Инкубацию в жиромерах можно вести на нагревательном столике Морозова с постоянным контролем температуры.

Для длительного сохранения культур анаэробных грибов без частого пересева использовалась методика глубокого замораживания в жидком азоте или морозильной камере при - 70^0C с введением в качестве криопротектора 5%-ного раствора диметилсульфоксида (101)

4.5. ИЗУЧЕНИЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ПРЕДЖЕЛУДКОВ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Одно из важных мест в углеводном питании жвачных животных занимает крахмал, являющийся основным компонентом зерен злаков и некоторых корнеплодов. Большая часть этого полисахарида ферментируется в преджелудках под действием энзимов микроорганизмов.

4.5.1. Выделение и культивирование крахмалгидролизующих бактерий

В настоящее время из рубца жвачных животных выделены и описаны амилолитические микробы, принадлежащие к различным систематическим группам: грамотрицательные и грамположительные кокки, палочки, образующие и не образующие споры, и спириллоподобные бактерии. Для выделения микроорганизмов из рубца жвачных животных предложено несколько питательных сред (102, 103). В своей работе для выделения амилолитических бактерий мы используем модифицированные нами ранее (14) среды. Крахмальный агар с рубцовой жидкостью: K_2HPO_4 - 0,2 г; KH_2PO_4 - 0,5 г; $(NH_4)_2S0_4$ - 0,5 г; NaCI -1 г; $MgSO_4$ - 0,1 г; $CaCI_2$ - 0,1 г; резазурин, 0,1%-ный раствор-1 мл; растворимый крахмал - 5,0 г; рубцовая жидкость - 400 мл; агар-агар - 20 г; вода дистиллированная до 1 л; цистеин солянокислый - 0,7 г; $NaHCO_3$ - 5 г.

Два последних ингредиента стерилизуются дробно, текучим паром и добавляются в среду непосредственно перед посевом, pH среды 6,8 - 7,0.

Крахмально-глюкозный агар с рубцовой жидкостью имеет следующий состав: раствор № 1 - 150 мл; раствор № 2 - 150 мл; растворимый крахмал - 4 г; глюкоза - 0,5 г; резазурин - 0,001 г; агар-агар -20г; рубцовая жидкость - 400 мл и дистиллированная вода - 300 мл. Растворы № 1 и № 2 по составу идентичны минеральным растворам № 1 и № 2 Брайанта и Берки (см. раздел 4.2.4), но содержат в 2 раза меньшие концентрации ингредиентов.

Среды нагревают до расплавления агара, разливают в пробирки по 5 мл, насыщают углекислым газом до обесцвечивания резазурина, закрывают резиновыми пробками и стерилизуют при 112^0C (0,5 атм.) - 30 мин.

Отдельно готовят и добавляют к среде непосредственно перед посевом цистеин - 0,05%, Na_2S0_3 - 0,025% и $NaHCO_3$ - 0,5%.

Смесь растворов цистеина и Na_2SO_3 в соотношении 2:1 вносят в каждую пробирку по 0,05 мл. 5 г $NaHCO_3$ растворяют в 30 мл дистиллированной воды и на 5 мл среды вносят 0,15 мл раствора. Растворы стерилизуют дробно текучим паром; pH среды 6,7 - 7,0.

Посев содержимого рубца производят методом ролл-тьюб в расплавленную и охлажденную питательную среду, насыщенную углекислым газом до обесцвечивания резазурина. Выросшие колонии микроорганизмов подсчитывают после 7 сут. культивирования при 39^0C.

Для выделения чистых культур крахмалгидролизующих микроорганизмов используют параллельные пробирки на более ранней стадии развития колоний. Последние отвивают в крахмально-пептонно-дрожжевой бульон, приготовленный по следующей прописи: KH_2PO_4 - 0,5 г; K_2HPO_4- 0,2 г: $(NH_4)_2SO_4$ - 0,5 г: NaCl - 1 г; $MgSO_4$ - 0,1 г; $CaCl_2$ - 0,1 г; резазурин, 0,1%-ный раствор - 1 мл; цистеин солянокислый - 0,7 г; $NaHCO_3$ - 5 г; крахмал растворимый - 2 г; пептон - 10 г; дрожжевой экстракт - 5 мл; вода дистиллированная до 1л.

Предварительно насыщенную углекислым газом среду стерилизуют при 112^0C (0,5 атм.) - 30 мин. Выращивание культур проводят в анаэробных условиях в течение 3 сут. Затем культуры, полученные на среде, исследуют на чистоту, подвижность, отношение к окраске по Граму, расположение клеток в мазках и для сохранения пересевают в высокий столбик полужидкого крахмально-пептонно-дрожжевого бульона следующего состава: KH_2PO_4 - 0,5 г; K_2HPO_4 - 0,2 г; $(NH_4)_2S0_4$ - 0,5 г; NaCl - 1 г; $CaCl_2$ - 0,1 г; $MgSO_4$ - 0,1 г; 0,1% - ный раствор резазурина - 1 мл; цистеин солянокислый - 0,5 г; $NaHCO_3$ - 5 г; крахмал растворимый - 3 г; пептон - 10 г; дрожжевой экстракт - 5 мл; агар-агар - 2 г; вода дистиллированная до 1 л.

Предварительно насыщенную углекислым газом среду стерилизуют при 112^0C (0,5 атм.) - 30 мин; pH 6,8 - 7,0.

Крахмально-пептонно-дрожжевой бульон можно использовать для количественного учета ассоциации амилолитических бактерий рубца методом предельных разведений. Данный метод требует особо тщательного соблюдения правил приготовления разведений содержимого и техники посева суспензии на питательные среды, так как каждая случайно занесенная клетка может привести сразу к значительной ошибке в численности микроорганизмов. В крахмально-пептонно-дрожжевой бульон обычно засевают содержимое рубца из разведений 10^{-5} - 10^{-11} в дозе 0,1 мл. Четкий рост в виде облачка наблюдается через 8 - 18 ч инкубации при 39^0C. Учет предельного титра амилолитических бактерий проводят через 3 сут после посева, подтверждая картину видимости роста микроскопией мазков из высоких разведений.

Для выделения амилолитических стрептококков рубца, способных использовать в качестве единственного источника азота мочевину, применяют синтетическую среду следующего состава (%): KH_2PO_4 - 0,3;

K_2HPO_4 - 0,3; $MgSO_4$ - 0,025; $FeSO_4$ - 0,001; $MnSO_4$ - 0,001; растворимый крахмал - 0,5; резазурин - 0,001; агар-агар - 2. Среду разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют под ватными пробками. Отдельно приготовляют и добавляют к среде перед посевом: мочевину - 0,3%, цистеин и сернистый натрий в соотношении 1:1 - 0,025%, раствор витаминов (на l00 мл среды по 0,1 мг рибофлавина, пантотената кальция, тиамина, ниацина; 0,04 мг пиридоксаля; 0,02 мг парааминобензойной кислоты; по 1 мкг биотина и фолиевой кислоты и 0,15 мкг цианкобаламина) и $NaHCO_3$ - 0,5%.

Дополнительные ингредиенты готовят следующим образом:

1. 10 г мочевины растворяют в 100 мл дистиллированной воды и пропускают через фильтр Зейтца. На каждую пробирку с 5 мл среды берут по 0,15 мл.

2. Смесь растворов цистеина и сульфида натрия в соотношении 1:1 вносят в каждую пробирку по 0,05 мл.

3. Смесь витаминов готовят непосредственно перед посевом из основных растворов, для получения которых разводят каждый витамин в 10 мл стерильной бидистиллированной воды. Для первых четырех берут навеску 10 мг, для парааминобензойной кислоты - 2 мг, пиридоксаля - 4 мг. Основные растворы трех последних витаминов получают разведением 1 мг фолиевой кислоты и биотина и 0,15 мг цианкобаламина в 10 мл воды и последующим 100-кратным разведением. Основные растворы витаминов кипятят на водяной бане 10 мин и сохраняют в холодильнике. Перед употреблением сливают по 1 части каждого витамина (из расчета 0,005 мл на 5 мл среды). Для большего удобства к 9 частям витаминов добавляют 11 частей стерильной воды. В каждую пробирку вносят по 0,1 мл полученной смеси.

4. 5 г углекислого натрия растворяют в 30 мл дистиллированной воды. Раствор стерилизуют в автоклаве. На 5 мл среды вносят 0,15 мл раствора.

Для уменьшения аэрации в момент внесения в среду дополнительных компонентов сливают растворы 1 и 4 (мочевина и углекислый натрий).

Расплавленные среды перед посевом помещают в водяную баню с температурой около 50^0С, где они и находятся во время подготовки к посеву. К моменту посева температуру в бане понижают до 45^0С.

Для насыщения сред используют углекислый газ. Напряжение струи его, проходящей через стерильную резиновую трубку и пипетку, регулируют редуктором. Насыщение каждой пробы проводят до создания анаэробиоза. Пробирку ставят в наклонный штатив, приспособленный специально для того, чтобы одновременно с насыщением проводить добавление компонентов среды и замену ватных пробок на резиновые. В этот же штатив помещают пробирки с приготовленными смесями. Резиновые пробки стерилизуют кипячением, а перед посевом погружают в чашку со спиртом и, в момент введения пробки в пробирку, обжигают на пламени спиртовки. Вся операция проводится в стериль-

ном боксе. Насыщенные CO_2 пробирки до посева вновь помещаются в водяную баню.

Посев в описанные выше среды проводят методом ролл-тьюб. В крахмальный и крахмально-глюкозный агар с рубцовой жидкостью посевной материал высевают в разведениях 10^{-5} - 10^{-8}, в синтетическую среду - 10^{-4} - 10^{-6}. Инокулированную пробирку плотно закрывают резиновой пробкой, тщательно обожженной на пламени спиртовки, и несколько раз перевертывают с тем, чтобы размешать инокулят и смочить средой стенки пробирки. Затем, поместив пробирку в сосуд с водой, быстрыми вращательными движениями распределяют среду равномерно по всей внутренней поверхности пробирки, оставляя наиболее толстый слой под пробкой. Инкубируют посевы при 39^0С. Продолжительность инкубации зависит от задач исследования. При проведении подсчета количества жизнеспособных амилолитических микроорганизмов рекомендуется инкубировать посевы до 7 сут. Для выделения культур амилолитических бактерий обычно используют параллельные пробирки на более ранних стадиях развития колоний.

Наиболее надежным тестом для определения колоний амилолитических бактерий на плотных средах является образование зон просветления вокруг них после орошения поверхности среды раствором Люголя. Гидролиз крахмала амилолитическими бактериями на плотных питательных средах можно обнаружить и без применения йодного реактива по дымчатым зонам, образующимся вокруг колоний.

Культуры амилолитических стрептококков, выделенные из рубца жвачных животных на плотных питательных средах, при последующем изучении их свойств обычно выращивают в крахмально-пептонно-дрожжевом бульоне, а для сохранения в коллекции пересевают в полужидкую крахмально-пептонно-дрожжевую среду.

4.5.2. Определение амилазной активности крахмалгидролизующих микроорганизмов фотометрическим методом

Метод основан на определении убыли крахмала под действием амилазы (15, 16). В зависимости от степени гидролиза крахмала меняется окраска йодкрахмального раствора. Последнюю определяют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре против дистиллированной воды и полученные результаты сравнивают с показателями контроля. Об активности амилазы судят по уменьшению концентрации крахмала после инкубации с ферментом (фильтрат культуральной жидкости). Амилазную активность выражают количеством расщепленного крахмала 1 мл фильтрата культуральной жидкости в течение 30 мин.

Реактивы. 1. Фосфатный буфер: раствор 1 - натрий фосфорнокислый двухзамещенный 11,876 г/л; раствор 2 - калий фосфорнокислый однозамещенный 9,078 г/л. Перед опытом готовят рабочий буферный раствор из семи частей раствора 1 и трех частей раствора 2.

2. Субстрат - свежеприготовленный 0,4%-ный раствор растворимого крахмала на фосфатном буфере (pH - 7,1).

3. 0,3%-ный раствор йода в 30%-ном растворе йодистого калия.

4. 1 н раствор соляной кислоты.

Определение. К 20 мл 0,4%-ного раствора крахмала на фосфатном буфере (39°С) добавляют 1 мл культуральной жидкости и инкубируют при 39°С в течение 30 мин. Затем для прекращения реакций добавляют 0,5 мл 1 н раствора соляной кислоты и хорошо взбалтывают. Для определения количества расщепленного крахмала 0,2 мл инкубационной смеси переносят в пробирки, приливают 5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл раствора йода, тщательно смешивают и колориметрируют против дистиллированной воды при длине волны 620 нм. Полученные результаты сравнивают с показателями контроля, который ставят с культуральной жидкостью (1 мл), прокипяченной для инактивации фермента, и 20 мл 0,4%-ного раствора крахмала.

Расчет расщепленного крахмала производят по следующей формуле:

$$\text{Количество расщепленного крахмала (мг)} = \frac{(А - Б) \cdot В}{А}$$

где А - показатель фотоколориметра - оптическая плотность контрольного раствора;

Б - показатель фотоколориметра - оптическая плотность исследуемого раствора;

В - количество субстрата, мг.

4.6. ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ РУБЦА ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Липолитические бактерии являются менее изученной группой рубцовой микрофлоры и, чтобы иметь ясное представление об их значении в липидном обмене жвачных, необходимы глубокие исследования физиолого-биохимических свойств этих микроорганизмов.

Для количественного учета и выделения липолитических микроорганизмов из рубца жвачных животных предложено несколько питательных сред (104). В своей работе для выделения липолитических бактерий мы используем несколько модифицированных нами сред (17, 18)

Среда 1. Минеральный раствор № 1 - 15 мл; минеральный раствор № 2 - 15 мл; рубцовая жидкость - 39 мл; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; вода дистиллированная - 27 мл; $NaHCO_3$ - 0,4 г; цистеин солянокислый - 0,05 г; льняное масло - 1 мл; агар-агар - 2 г; pH среды 6,8.

Среда 2 отличается от предыдущей тем, что вместо льняного масла в нее вводят трибутирин.

Среда 3. Минеральный раствор № 1 - 15 мл; минеральный раствор № 2 - 15 мл; рубцовая жидкость - 20 мл; резазурин, 0,1%-ный раствор - 0,1 мл; $NaHCO_3$ - 0,4 г; цистеин солянокислый - 0,05 г; льняное масло - 1

мл; агар-агар - 2 г; н - валериат - 0,0019 г; биотин - 0,01 г; вода дистиллированная до 100 мл; pH среды 6,8.

Среда 4 отличается от среды 3 тем, что вместо льняного масла в нее вводится трибутирин.

Минеральные растворы № 1 и № 2 идентичны по составу таковым Брайанта и Берки (см. раздел 4.2.4.), но содержат в 2 раза меньшие концентрации ингредиентов.

Приготовление питательных сред состоит в следующем.

Для приготовления сред 1 и 2, минеральные растворы, рубцовую жидкость, резазурин, агар-агар и дистиллированную воду смешивают и стерилизуют при 121^0C в течение 20 мин. $NaHCO_3$ и цистеин стерилизуют при 112^0C в течение 20 мин. Льняное масло или трибутирин смешивают с 1 мл рубцовой жидкости, простерилизованной при 121^0C в течение 15 минут, и добавляют к среде непосредственно перед посевом.

Среды 3 и 4. Смешивают минеральные растворы, рубцовую жидкость, резазурин, агар-агар и дистиллированную воду и автоклавируют при 121°C (1 атм.) в течение 15 мин. $NaHCO_3$, цистеин и н-валериат растворяют в 15 мл дистиллированной воды, стерилизуют при 112^0C (0,5 атм.) в течение 20 мин и вносят в первую часть среды, туда же добавляют биотин. Льняное масло или трибутирин смешивают с 1 мл рубцовой жидкости, простерилизованной при 121^0C в течение 20 мин, и добавляют к среде, имеющей температуру не выше 70^0C. Среды насыщают CO_2 и плотно закрывают резиновыми пробками.

Разведения содержимого рубца для посева готовят на солевом растворе Дейтча с соавт. (см. раздел 4.2.4), а посев проводят методом ролл-тьюб.

Результаты учитывают по зонам просветления, которые появляются вокруг колоний после 5-суточной инкубации (качественный метод определения липолитической активности). На описанных выше средах липолитические бактерии образуют колонии различной величины, формы и цвета. Большинство колоний с ровными краями, двояковыпуклой формы, с гладкой блестящей поверхностью, серого или различных оттенков коричневого цвета, а иногда матовые. Колонии липолитических микроорганизмов растут как в глубине, так и на поверхности среды. Чаще всего бактерии образуют очень мелкие точечные колонии, трудноразличимые невооруженным глазом, и лишь по зонам просветления можно определить их локализацию.

Для выделения чистых культур липолитических микроорганизмов используют изолированные колонии на более ранней стадии развития. Последние отвивают на пептонно-дрожжевой бульон с льняным маслом или трибутирином: KH_2PO_4 - 0,5 г; K_2HPO_4 - 0,2 г; $CaCl_2$ - 0,1 г; $(NH_4)_2SO_4$ - 0,5 г; NaCl - 1 г; $MgSO_4$ - 0,1 г; резазурин, 0,1% - ный раствор 1 мл; $NaHCO_3$ - 5 г: цистеин солянокислый - 0,05 г; трибутирин или льняное масло - 10 мл; пептон - 10 г; дрожжевой экстракт - 5 мл; вода дистиллированная до 1 л; pH среды - 6,8.

4.7. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ У ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ РУБЦА

При постановке физиолого-биохимических тестов с анаэробными бактериями чаще всего используют предварительно восстановленный пептонно-дрожжевой бульон РУ по Холдеману с соавт. (112). Среда имеет следующий состав: пептон - 5 г; триптиказа - 5 г; дрожжевой экстракт - 10 г; резазурин, 0,25%-ный раствор - 4 мл; солевой раствор - 40 мл; раствор гемина - 10 мл; раствор витамина $К_1$ - 0,2 мл; цистеин солянокислый - 0,5 г; дистиллированная вода - 1000 мл.

Солевой раствор: 0,2 г $CaCl_2$ (безводный); 0,48 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 г K_2HPO_4; 1 г KH_2PO_4; 10 г $NaHCO_3$; 2 г NaCl. Хлористый кальций и сульфат магния растворяют в 300 мл дистиллированной воды. Вливают 500 мл дистиллированной воды и, помешивая, добавляют остальные соли. После растворения солей добавляют 200 мл дистиллированной воды.

Приготовление растворов гемина и витамина $К_1$ приведено в разделе 4.1.4.

Для приготовления бульона РУ сухие ингредиенты (кроме цистеина) помещают в колбу с вертикальным отводом, предназначенным для предотвращения перекипания. Для приготовления 750 мл среды используют 1-литровую колбу, а для приготовления 500 мл среды - 750мл колбу. Добавляют воду, солевой раствор и резазурин. Кипятят до тех пор, пока не исчезнет розовая окраска среды. Снимают колбу с огня и вместо отвода устанавливают форштосс с двумя отводами, в один из которых вставлена газоотводная трубка. Во время охлаждения среды в ледяной бане до комнатной температуры через нее пропускают очищенный от кислорода углекислый газ. Добавляют растворы гемина, витамина $К_1$ и цистеин. Доводят pH смеси до 7,1 с помощью 8 н NaOH. Продувание CO_2 продолжают до тех пер, пока pH не снизится до 6,9. Затем, пропуская через среду очищенный от кислорода азот, ее разливают в пробирки, через которые предварительно был пропущен азот. После извлечения газоотводной трубки пробирки закрывают резиновыми пробками. Автоклавируют в течение 15 мин в зажимном устройстве в автоклаве с быстрым вытеснением воздуха и затем охлаждают. Пробирки, в которых среда окрашивается в бледно-розовый цвет, свидетельствующий о ее окислении, выбраковывают.

Количества субстратов, вводимых в среду РУ для изучения физиологических тестов, и продолжительность их автоклавирования представлены в таблице 4.7.а. по Холдеману с соавт. (112).

Таблица 4.7.а.

Условия постановки физиолого-биохимических тестов с анаэробными бактериями

Субстрат	Количество в 100 мл среды, г	Продолжительность автоклавирования, мин
1	2	3
Адонитол	0,5	15
Амигдалин	0,5	15
Арабиноза (L)	0,5	12
Аргинин	0,3	15
Целлобиоза	1,0	15
Дульцитол	1,0	15
Эритритол (DL)	0,5	15
Эскулин	0,5	15
Фруктоза (D)	1,0	15
Галактоза (D)	1,0	15
Глюкоза	1,0	15
Глицерол	0,8 мл	15
Гликоген	0,5	15
Гиппурат	1,0	15
Инозитол	1,0	15
Инулин	1,0	15
Лактат	1,0	15
Лактоза	1,0	15
Мальтоза (D+)	1,0	15
Маннитол (D+)	1,0	15
Манноза (D+)	1,0	15
Мелизитоза	0,5	15
Мелибиоза	0,5	15
Пируват	0,9	12
Раффиноза (D+)	1,0	15
Рамноза	1,0	15
Рибоза (D+)	0,5	12
Салицин	1,0	15
Сорбитол (D)	1,0	15
Сорбоза (L)	1,0	15
Крахмал растворимый	1,0	15
Сахароза	1,0	15
Треонин (DL)	0,3	12
Трегалоза	0,5	15
Ксилоза (D)	1,0	12

4.7.1. Образование кислот и газов из углеводов

При подготовке среды в нее кроме испытуемого углевода вводят pH-индикатор. Наиболее часто используемые pH-индикаторы и их свойства представлены в таблице 4.7.б

Таблица 4.7. б

pH - индикаторы для культуральных сред

Наименование	pK[1]	Диапазон pH и окраска[1)]	Обычно применяемая концентрация в среде, г/л[2)]	Количество 0,01 н NaOH (мл), необходимое для растворения 0,1г
Феноловый красный	7,8	6,9(Ж)-8,5(К)	0,010-0,030	28,2
Бромтимоловый синий	7,1	6,1(Ж)-7,7(С)	0,010-0,032	16,0
Бромкрезоловый пурпурный	6,2	5,4(Ж)-7,0(П)	0,010-0,032	18,5
Хлорфеноловый красный	6,0	5,1(Ж)-6,7(К)	0,015	23.6
Бромкрезоловый зеленый	4,7	3,8(Ж)-5,4(С)	0,020	14,3

1) Обозначения: Ж - желтая, С - синяя, П - пурпурная, К- красная.
2) Для добавления в культуральную среду растворяют в спирте или готовят водный раствор, используя 0,01 н NaOH.

В случаях, когда индикатор токсичен для бактерий или разлагается в процессе их роста, его добавляют каплями (0,02 - 0,04%-ного спиртового раствора) в культуру после окончания роста. Если применение индикатора нежелательно, а также для обеспечения более высокой точности, pH культуры измеряют по окончании роста с помощью pH-метра.

В случае, когда анаэробные бактерии культивируют в предварительно восстановленном пептонно-дрожжевом бульоне (PY) с углеводами (см. выше), двуокись углерода, которую пропускают через пробирку во время инокуляции для предотвращения попадания кислорода, обычно снижает pH среды до 6,2 - 6,4. Вследствие этого культуры, выращиваемые на углеводном пептонно-дрожжевом бульоне, обычно считаются подкисленными, если их pH составляет 5,5 - 6,0 (слабая кислота) или оказывается ниже 5,5 (сильная кислота). Для культур, выращенных на пептонно-дрожжевом бульоне, содержащем арабинозу, рибозу или ксилозу, pH 5,7 или ниже обычно означает подкисление, поскольку стерильная среда, через которую пропускали CO_2 , после 1 - 2 дней инкубации имеет pH 5,9 (112). В любом случае в качестве контроля следует определять pH культур в пептонно-дрожжевом бульоне, не содержащем никаких углеводов, так как в некоторых случаях могут образовываться кислоты из пептонов.

Вместе с образованием кислоты обычно определяют и газообразование из сахаров. С этой целью перед автоклавированием бульона с углеводами в пробирку помещают вверх дном стеклянный поплавок (5 - 7×35 - 40 мм). После автоклавирования он полностью заполняется средой. В случае термолабильных сахаров после автоклавирования и остывания к основной среде с соблюдением правил асептики добавляют их концентрированные растворы, стерилизованные фильтрованием. Пробирки оставляют приблизительно на день для диффузии сахаров в перевернутые поплавки. Среду инокулируют и инкубируют при оптимальной для роста культуры температуре. Положительный результат - накопление газа в поплавке. Следует однако отметить, что если среду до использования хранят в холодильнике, а затем инокулируют и инкубируют, растворенные в среде газы могут высвобождаться и накапливаться в поплавках, приводя к ложноположительным результатам. В этом случае в качестве контроля используют стерильные пробы.

Если клетки образуют очень небольшое количество CO_2, ее трудно обнаружить из-за высокой растворимости и быстрой диффузии в воздух. Для предотвращения диффузии CO_2 в воздух в пробирку после инокуляции добавляют 1 мл стерильного вазелинового масла.

Другой высокочувствительный метод предполагает использование агаризованной среды с углеводами. Среду расплавляют, охлаждают до 45^0C, инокулируют испытуемой культурой и позволяют агару затвердеть. Затем застывший столбик агара покрывают приблизительно 6 мм слоем 2%-ного "голодного" агара (т.е. агара, приготовленного на воде) и наслаивают тонкий слой стерильного минерального масла. Культуры инкубируют. Положительный результат - разрывы в среде и поднятие слоя "голодного" агара.

Для анаэробов используют предварительно восстановленный пептонно-дрожжевой агар PY, содержащий 1% глюкозы. Среду расплавляют, охлаждают до 45^0C и инокулируют 2 - 3 каплями культуры. Пробирки закрывают стерильной алюминиевой фольгой, оставляют до затвердения среды и инкубируют. Положительный результат - образование пузырьков газа или разрывов в агаре.

4.7.2. Гидролиз эскулина

Культуры выращивают в бульоне или на подходящей агаровой среде с добавлением 0,01% эскулина и 0,05% лимоннокислого железа. Положительная реакция - появление коричневато-черной окраски среды.

4.7.3. Гидролиз крахмала

Готовят агаровую среду, на которой культура способна хорошо расти, добавляют 0,2% растворимого крахмала и кипятят. Среда не должна содержать глюкозы, так как в ее присутствии гидролиз крахмала может ингибироваться (120). Среду стерилизуют при 112^0C (0,5 атм.) в течение

10 мин. После охлаждения среды до 45 - 50^{0}С ее разливают в чашки Петри и на поверхность застывшего агара штрихом через центр чашки высевают испытуемые культуры. После инкубации агар заливают раствором йода (можно использовать раствор Люголя, применяемый для окраски по Граму). Положительная реакция - появление бесцветного участка вокруг зоны роста.

4.7.4. Гидролиз гиппурата

Наиболее быстрый метод определения гидролиза гиппурата предложен Хвэнгом и Эдерером (113). Готовят 1%-ный раствор гиппурата натрия в дистиллированной воде и разливают в пробирки по 0,4 мл. Затем с поверхности плотной среды берут полную петлю выросшей культуры и делают густую суспензию бактерий в растворе гиппурата. Пробирку инкубируют в термостате или в водяной бане при 37^{0}С в течение 2 ч. После инкубации добавляют приблизительно 0,2 мл нингидринового реактива (3,5 г нингидрина растворяют в 100 мл смеси ацетона и бутанола в соотношении 1:1 по объему). Пробирку не встряхивают. Инкубацию продолжают при 37°С в течение 10 мин. Положительная реакция - появление темно-фиолетовой окраски за счет глицина, образующегося при гидролизе гиппурата. Отрицательная реакция - отсутствие окраски или наличие лишь слабого фиолетового оттенка. Для большей наглядности следует использовать контрольные пробы с микроорганизмами, для которых реакция уже известна.

4.7.5. Гидролиз желатины

Готовят пригодную для культивирования испытуемых бактерий среду с 12% желатины. Устанавливают pH 7 - 7,2 и стерилизуют дробно по 15 - 20 мин три дня подряд или при 110^{0}С в течение 15 мин однократно. При этом необходимо помнить, что при кислой или щелочной реакции, а также при сильном перегревании желатина теряет способность застывать.

Готовую среду инокулируют уколом и пробы инкубируют при 20 - 22°С до 6 недель. Положительная реакция - разжижение по меньшей мере части среды.

Если температура 22^{0}С низка для роста, то культуру инкубируют при оптимальной температуре роста, а затем охлаждают в холодильнике вместе с неинокулированной контрольной пробой. Если среда не затвердевает, то это свидетельствует о гидролизе желатины; если же она затвердевает, то ее переносят вместе с контрольной пробой в помещение с комнатной температурой или в термостат с температурой 30^{0}С. Инкубируют в наклонном положении около 30 мин. Когда среда в опытной пробе разжижается раньше, чем в контрольной, этот результат расценивается как слабая положительная реакция, чувствительность этого метода может быть повышена снижением концентрации желатины в среде до 4%.

При изучении аэробных организмов, а также с целью повышения чувствительности теста, может быть использована агаровая среда с добавкой 0,4% желатины. Пластинки среды в чашках инокулируют штрихом и инкубируют при оптимальной для роста испытуемого организма температуре и затем заливают чашки реактивом, осаждающим желатину [15% $HgCl_2$ в 20%-ной (по объему) конц. HCl] . Положительная реакция - появление зон просветления вокруг колоний.

4. 7.6. Гидролиз казеина

Стерильное (автоклавированное) снятое молоко смешивают при 50^0C с равным объемом питательного агара (экстракт из говяжьего мяса - 3 г, пептон - 5 г, агар - 15 г, дистиллированная вода - 1000 мл, pH 6,8) двойной концентрации или другой не содержащей углеводов агаровой среды при 50 - 55^0C и разливают в чашки. Застывшую среду инокулируют штрихом, инкубируют до 14 дней и проверяют на наличие просветления вокруг зон роста. Результаты считывают с помощью заливки среды 10%-ной HCl. Образование кислоты из лактозы может подавлять гидролиз казеина, поэтому снятое молоко необходимо предварительно диализовать.

4.7.7. Образование аммиака из аргинина

При постановке этого теста обычно используют аргининовый бульон Нивена с соавт. (115) или аргининовый бульон Эванса и Нивена (111).

Бульон Нивена с соавт. содержит (г/л): дрожжевой экстракт - 5 г; триптон - 5 г; K_2HPO_4 - 2 г; глюкоза (декстроза) - 0,5 г; L-аргинин · HCl - 3 г; дистиллированная вода - 1000 мл. Компоненты смешивают и растворяют при нагревании. Доводят pH до 7,0, кипятят, фильтруют и стерилизуют автоклавированием (112^0C - 20 мин).

Бульон Эванса и Нивена содержит (г/л): триптон - 10 г; дрожжевой экстракт - 5 г; NaCl - 5 г; L-аргинин · HCl - 3 г; дистиллированная вода - 1000 мл. Ингредиенты смешивают и растворяют при нагревании. Доводят pH до 7,0, кипятят, фильтруют и стерилизуют автоклавированием (112^0C - 20 мин).

Инокулируют аргининовый и контрольный (без аргинина) бульоны испытуемыми культурами и инкубируют при оптимальной температуре в течение 2 - 3 дней. Затем культуры анализируют в спот-тесте с реактивом Несслера. Положительная реакция - появление желтой или оранжевой окраски в отличие от контроля, цвет которого не изменяется.

Реактив Несслера готовят следующим образом. Растворяют 5 г KJ в 5 мл дистиллированной (безаммиачной) воды и добавляют насыщенный раствор $HgCl_2$ (около 2 г в 35 мл) до образования осадка, свидетельствующего об избытке сулемы. Затем добавляют 20 мл 5 н NaOH, доводят смесь до 100 мл дистиллированной водой и ставят на отстой в темное место в плотно закупоренном темном флаконе. После оседания

осадка прозрачную надосадочную жидкость сливают и используют в спот-тесте.

Для обнаружения аммиака в исследуемой культуре применяют также бумажки, обработанные заранее реактивом Несслера или Крупа. Полоски реактивных бумажек помещают в пробирки, не касаясь поверхности культуры, и фиксируют ватной или резиновой пробкой. В таком виде пробирки с исследуемыми культурами инкубируют в течение суток. При положительной реакции на аммиак реактивные бумажки по Несслеру буреют, а по Крупу - краснеют. При отрицательной реакции на аммиак культуры выдерживают в термостате еще в течение пяти суток, после чего делают окончательное заключение. Пожелтение бумажки с реактивом Несслера за время пребывания пробы в термостате не считается за положительную реакцию.

Реактивную бумагу готовят путем пропитывания тонкой фильтровальной бумаги реактивом Несслера и последующего ее высушивания в сухом месте. Хорошо приготовленная реактивная бумага должна быть слегка сероватой, но не бурого или желтого цвета и без пятен. Бумага, нарезанная на полоски (8 - 9×0,5 -1 см), может сохраняться в течение нескольких месяцев в темной банке с притертой пробкой.

Для приготовления реактивной бумаги по Крупу смешивают 1 мл 3%-ной серной кислоты и 2 мл 1%-ного водного раствора фуксина (готовят из насыщенного спиртового раствора). Когда жидкость станет бурого цвета, ею пропитывают листы тонкой фильтровальной бумаги и быстро высушивают. Реактивная бумага должна быть бесцветной или слегка желтой. Бумагу режут на полоски и хранят в банке с притертой пробкой. Сохраняется долгое время.

4.7.8. Образование сероводорода

Одним из типичных признаков для ряда микроорганизмов является образование H_2S в процессе разложения белковых веществ. Обнаружение сероводорода легко удается при помощи полоски фильтровальной бумаги, смоченной раствором уксуснокислого свинца и фиксированной в пробирке ватной пробкой. В положительном случае после нескольких дней инкубации наблюдается почернение нижней части полоски.

При приготовлении реактивной бумаги тонкую фильтровальную бумагу разрезают на полоски 0,5 - 1×8 - 10 см и погружают в 5%-ный раствор ацетата свинца [$Pb(CH_3COO)_2$]. Полоски стерилизуют в пробирках, закрытых ватными пробками, и сушат в сушильном шкафу.

Для постановки теста инокулируют пробирку с жидкой средой, содержащей источник серы (обычно пептон или тиосульфат натрия от 0,008 до 0,03%). Перед инкубацией в пробирку помещают бумажную полоску так, чтобы ее конец находился приблизительно на 1,3 см выше уровня среды, а верхнюю часть полоски закрепляют ватной пробкой. При исследовании на сероводород нельзя закрывать пробирки резиновыми колпачками или пробками, так как сама резина обычно содержит сероводород.

Для обнаружения образования H_2S у анаэробов с успехом применяют подходящие для культивирования испытуемых культур среды с 4% пептона и 2,5% агара. Среду разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют. Отдельно стерилизуют 0,25%-ный водный раствор уксуснокислого свинца. В пробирку расплавленного и охлажденного до 50 - 60^0 С агара стерильно добавляют по 1 мл приготовленного раствора свинца, после чего агару дают застыть столбиком. После проверки на стерильность агар инокулируют по стенке пробирки испытуемой культурой. При образовании сероводорода вдоль штриха наблюдается побурение или почернение среды.

4.7.9. Образование индола

Важным дифференциальным признаком является образование индола - продукта распада белковых веществ. Предложено много методов определения индолообразования, но мы остановимся на наиболее распространенных.

Реакция со щавелевой кислотой является одной из наиболее доступных и надежных реакций на индол. Фильтровальную бумагу обливают горячим насыщенным (12%) водным раствором щавелевой кислоты. После высушивания в термостате бумагу, покрытую кристаллами щавелевой кислоты, режут на полоски (0,5×10 см) и хранят в банке с притертой пробкой. Для обнаружения индола в засеянную пробирку помещают полоску такой бумаги и удерживают ее ватной пробкой. Нижний край бумажки не должен прикасаться к среде. Спустя 1 - 3 дня после инокуляции и инкубации посевов при подходящей температуре при образовании индола нижняя часть бумажки окрашивается в розовый или красный цвет.

При постановке теста на образование индола используют безуглеводные и безнитратные жидкие среды, содержащие источник триптофана (например, 1%-ную пептонную воду, бульон Хоттингера, 1%-ный триптоновый бульон или среду с 0,1% L-триптофана). Если ростовая среда содержит углевод, синтез триптофаназы - фермента, ответственного за образование индола - может подавляться (106). Кроме того, обнаружению индола может препятствовать нитрит в концентрации 0,75 мг/мл или выше (119). Поэтому присутствие нитрата в среде может приводить к ложноположительному результату, если организм способен восстанавливать нитрат до нитрита.

Достаточно высокую чувствительность теста на индол обеспечивает применение реактива Эрлиха, который имеет следующий состав: n-диметиламинобензальдегид - 1 г; этанол, 95%-ный - 95 мл; концентрированная соляная кислота - 20 мл. Альдегид растворяют в этаноле и затем добавляют кислоту. Хранят в холодильнике в защищенном от света месте.

Испытывают культуры различного возраста следующим способом: добавляют 1 мл ксилола (или толуола, насыщенного водой), культуру сильно встряхивают для экстрагирования индола и затем оставляют до

образования на поверхности слоя ксилола. Держа пробирку наклонно, вливают 0,5 мл реактива Эрлиха тонкой струйкой по стенке пробирки до образования слоя между ксилолом и бульоном. Пробы оставляют стоять 5 мин. Появление красного кольца под слоем ксилола указывает на образование индола. Так же проверяют контрольную пробу с неинокулированной средой.

Более безопасным, но менее чувствительным является метод определения индола с реактивом Ковача (19), который имеет следующий состав: n-диметиламинобензальдегид - 3 г; амиловый или бутиловый спирт - 75 мл; концентрированная соляная кислота - 25 мл. Альдегид растворяют в спирте при 50 - 55^{0}С. Раствор охлаждают, добавляют к нему кислоту и хранят в холодильнике в защищенном от света месте. При постановке теста экстракцию ксилолом не проводят, а 0,5 мл реактива Ковача добавляют в бульонную культуру и пробирку осторожно встряхивают. Положительная реакция - появление красной окраски.

4.7.10. Воздействие на лакмусовое молоко

Обычно в этом тесте используют лакмусовое молоко, для приготовления которого используют спиртовой раствор лакмуса. Для его приготовления измельчают в ступке со 150 мл 40%-ного спирта-ректификата 50 г лакмуса. Смесь переливают в колбу и осторожно кипятят 1 мин в паровой бане. Жидкость декантируют и хранят отдельно. К осадку добавляют еще 150 мл 40%-ного спирта и снова кипятят 1 мин. Надосадочную жидкость декантируют и объединяют с предыдущей порцией. Объединенную порцию оставляют на ночь и затем разбавляют 40%-ным спиртом до 300 мл. Доводят pH до 7,0, добавляя по каплям 1 н HCl.

Для приготовления лакмусового молока берут 1 л снятого молока и добавляют достаточное количестве лакмуса до появления сине-фиолетовой окраски (обычно 40 мл на 1 л). Доводят pH смеси до 7,0, добавляя 1н NaOH. Стерилизуют автоклавированием при 112^{0}С - 10 мин или текучим паром при I00^{0}С по 20 мин три дня подряд. Перегревание приводит к карамелизации. Молоко свертывается при pH 4,6. Для исследования анаэробов Холдеман с соавт. (112) предложили предварительно восстановленную молочную среду следующего состава: свежее снятое молоко - 100 мл; резазурин, 0,025%-ный раствор - 0,4 мл; раствор гемина - 1 мл; раствор витамина K_1 - 0,02 мл.

В колбу наливают молоко, добавляют резазурин и готовят среду так же, как пептонно-дрожжевой бульон PY (см.4.7.). После кипячения и остывания добавляют гемин и витамин K_1. После пропускания CO_2 pH должен быть 7,1. Среду разливают в пробирки, через которые был пропущен газообразный азот, закрывают пробками, помещают в зажимное устройство и автоклавируют при 121^{0}С в течение 12 мин.

Лакмусовое молоко инокулируют испытуемыми культурами и инкубируют при 38 - 39^{0}С в течение недели, ежедневно учитывая результаты. Реакции культур могут быть следующими. Подкисление: появление

розовой окраски. Подщелачивание: появление синей окраски. Восстановление лакмуса: молоко становится белым за счет обесцвечивания лакмуса, что обычно происходит в нижней части пробирки. Кислый творожистый осадок: твердый розовый сгусток, который растворяется в щелочи и не сжимается. Творожистый осадок сычужного типа: мягкий нерастворимый в щелочи сгусток, при сжатии которого отделяется сероватая сыворотка. Пептонизация (протеолиз): молоко становится полупрозрачным в результате гидролиза казеина, начинающегося чаще в верхней части столбика среды. При этом нередко среда становится щелочной.

При исследовании анаэробов инокуляцию предварительно восстановленной молочной среды проводят при пропускании через пробирку свободной от кислорода CO_2. Инкубацию осуществляют до 3 недель и периодически проверяют наличие творожистого осадка или появление пептонизации.

4.7.11. Редукция нитратов и денитрификация

В микробиологии редукцией нитратов, или денитрификацией, называют способность микроорганизмов восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты (нитриты), а затем в аммиак или свободный азот.

При постановке теста на редукцию нитратов обычно используют подходящие для роста испытуемых культур - жидкие или полужидкие, безуглеводные питательные среды, например мясо-пептонный бульон (МПБ), в которые в качестве источника нитрата добавляют калийную селитру (KNO_3), а для визуализации реакции используют диагностический реактив Грисса или его модификации (19, 20).

При приготовлении реактива Грисса готовят два раствора.

I. 0,2 г α - нафтиламина ($C_{10}H_7NH_2$) растворяют при нагревании в фарфоровой чашке с 20 мл дистиллированной воды, затем жидкость осторожно сливают со 150 мл 12%-ной уксусной кислоты. Не растворившаяся часть вещества в виде фиолетовых капель должна остаться в чашке.

II. 0,5 г сульфаниловой кислоты ($C_6H_4NH_2S0_3H$ - сульфамидобензойная кислота) растворяют в 150 мл 12%-ной уксусной кислоты.

Растворы I и II сливают. Смесь хранят в темном флаконе с притертой пробкой. Готовый реактив должен быть бесцветным. Порозовевший реактив непригоден. Реактив следует готовить быстро.

Диагностический реактив № 1 состоит также из двух растворов (19).

Раствор А: N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорид (Sigma) - 0,02 г; соляная кислота, 1,5 н раствор - 100 мл. Смесь растворяют, осторожно нагревая в вытяжном шкафу.

Раствор Б: сульфаниловая кислота - 1 г; соляная кислота, 1,5н раствор - 100 мл. Растворяют, осторожно нагревая на слабом огне.

Реактив получают, смешивая равные объемы растворов А и Б непосредственно перед использованием.

Диагностический реактив № 2 (19).

Раствор А: N,N-диметил-1-нафтиламиндигидрохлорид (Sigma) - 0,6 г или нафтиламин - 0,5 г; 5 н раствор уксусной кислоты - 100 мл. Растворяют, осторожно нагревая в вытяжном шкафу.

Раствор Б: сульфаниловая кислота - 0,8 г; 5 н раствор уксусной кислоты - 100 мл. Растворяют, осторожно нагревая в вытяжном шкафу.

Реактив получают, смешивая равные объемы растворов А и Б непосредственно перед использованием.

Осторожно: Управление по профессиональной безопасности и здоровью (OSHA) объявило α-нафтиламин канцерогеном. Хотя N-(1-нафтил)-этилендиамин и N,N-диметил-1-нафтиламин не включены в список канцерогенов, их также можно считать опасными ввиду структурного сходства с α-нафтиламином. Поэтому следует соблюдать все предосторожности в отношении использования, обработки и последующего уничтожения этих соединений.

В зарубежных лабораториях для количественного определения нитритов используют метод Нэйра с соавт. (114). Для постановки теста инокулируют подходящую жидкую питательную среду, содержащую 0,1% KNO_3 и 0,17% агара (последний добавляют для получения полужидкой консистенции и создания полуанаэробных условий). Инокулят смешивают со средой очень осторожно, равномерно распределяя его по пробирке. Во время инкубации периодически просматривают культуры для обнаружения пузырьков, что может служить предварительным указанием на денитрификацию. Контрольные культуры, выращенные без нитрата, не должны выделять газ и давать положительную реакцию на нитрит. Для определения способности микроорганизмов восстанавливать нитрат в нитрит берут по 0,1 мл культур различного возраста и добавляют к ним по 2 мл диагностического реактива № 1 или № 2. Затем добавляют воду до конечного объема 4 мл и оставляют на 15 мин для развития окраски. Интенсивность окраски измеряют визуально по пятибальной шкале или с помощью спектрофотометра при 540 нм. Накопление нитрита с увеличением возраста культуры означает восстановление нитрата до нитрита, в то время как образование вначале нитрита с последующим снижением его уровня означает способность к дальнейшему восстановлению нитрита. Если красная окраска не появляется, добавляют по 5 мг цинковой пыли на каждый миллилитр смеси. Если нитрат в среде не восстановился, то добавление цинка приведет к его химическому восстановлению, о чем свидетельствует появление красной окраски. Отсутствие окраски означает, что организм восстановил весь нитрит и, по-видимому, произошла денитрификация. В этом случае положительную реакцию на нитрит можно получить при исследовании более молодой культуры. Необходимо также иметь ввиду, что цинковая пыль при длительном хранении может инактивироваться, поэтому следует периодически проверять ее способность восстанавливать нитрат в нитрит на неинокулированной пробе. Образование газа при выращивании культур в нитратном бульоне без агара может быть продемонстрировано с

помощью перевернутых поплавков, которые улавливают образующийся во время денитрификации газ.

Редукция нитратов может быть определена и без использования токсичных веществ (20). К свежеприготовленному МПБ добавляют 0,2% KNO_3, свободного от нитритов, и разливают по 5 мл в пробирки. Среду стерилизуют при 120^0С в течение 15 мин. Бульон до и после прибавления калийной селитры необходимо проверить на отсутствие нитритов.

Приготовление реактива. 1. Берут I г растворимого крахмала на 100 мл кипящей дистиллированной воды и после охлаждения раствора добавляют 0,5 г йодистого калия.

2. Готовят 10%-ный водный раствор химически чистой серной кислоты.

Растворы 1 и 2 смешивают в равных объемах перед постановкой реакции. Срок годности готового реактива - 15 мин. Для постановки реакции используют 2 - 3-суточные культуры, в которые добавляют по 1 мл реактива. При редукции нитратов в нитриты культура окрашивается в темно-синий цвет.

Эта реакция может быть поставлена в следующей модификации. Исследуемую культуру высевают в МПБ с 1% KNO_3 и выращивают в течение 48 - 72 ч в термостате. Затем добавляют к ней 0,3 - 0,5 мл 0,5%-ного раствора растворимого крахмала, 0,3 - 0,5 мл 0,5%-ного водного раствора йодистого калия и 1 каплю 5%-ного раствора серной кислоты. При положительной реакции культура окрашивается в темно-синий до коричневого цвета, а при отрицательной - среда бесцветная или же принимает слабо-синий цвет.

Некоторые микроорганизмы могут разрушать как нитрат, так и нитрит. Поэтому в отрицательных случаях в пробирку рекомендуют добавлять щепотку гранулированного или порошкообразного цинка и жидкость в норме должна тотчас же посинеть. Отсутствие посинения среды после добавления цинка указывает на полное разрушение нитрата и нитрита.

4.7.12. Исследование гемолитических свойств

Ряд микроорганизмов вырабатывает гемолизины, обладающие способностью растворять эритроциты. На агаре с кровью по окружности микробных колоний, вырабатывающих гемолизины, образуются зоны просветления. Различают α, α^1 и β - гемолиз (19). В результате α-гемолиза образуется нечеткая зона частично разрушенных эритроцитов, часто с появлением зеленовато-коричневой окраски среды. В результате α^1-гемолиза непосредственно вокруг колоний образуется небольшой ореол из целых или частично лизированных эритроцитов, а к нему примыкает зона полного гемолиза, распространяющаяся далее в среду. При визуальном просмотре α^1-гемолиз можно спутать с β-гемолизом, при котором вокруг колоний образуются прозрачные бесцветные зоны. Некоторые бактерии, например определенные стафилококки, осуществляют β-гемолиз только в том случае, если чашки с инокулированной средой предварительно ин-

кубируют 48 ч при 37^0С, а затем охлаждают в холодильнике в течение 1 ч (горяче-холодный гемолиз). На бульоне с кровью при наличии гемолинов происходит растворение эритроцитов и среда из мутной превращается в прозрачную и окрашивается в равномерно красный цвет. При отсутствии гемолинов эритроциты в бульоне через сутки оседают на дно, а среда становится прозрачной.

Для приготовления кровяного агара к стерильному расплавленному и охлажденному до 45^0С добавляют 5% (по объему) стерильной дефибринированной крови, осторожно перемешивают путем кругообразных движений (избегать образования пены!) и разливают по чашкам. Обычно предпочитают овечью или кроличью кровь. Лошадиная кровь может давать искаженные гемолитические реакции. Правильно приготовленный кровяной агар должен быть мутным и равномерно окрашенным в красный цвет. При добавлении крови в горячий агар (свыше 45^0С) среда получается темной и непригодной для посевов.

Гемолитические свойства на жидких питательных средах изучаются следующим образом. К обычному МПБ стерильно добавляют дефибринированную кровь в отношении 1 часть крови на 4 части среды, взбалтывают, проводят посев, инкубируют в термостате 24 ч.

Дефибринированную кровь готовят следующим образом: в стерильных условиях отбирают кровь шприцем с иглой № 18 (для предотвращения гемолиза, вызываемого механическим разрушением) и немедленно переливают ее в стерильную колбу, в которую помещен слой стерильных стеклянных шариков, диаметром около 3 мм. Колбу встряхивают в горизонтальной плоскости в течение 10 мин. Фибрин, образовавшийся во время свертывания, остается на шариках. Надосадочную жидкость, содержащую клетки крови и сыворотку, сливают в стерильный сосуд и хранят в холодильнике.

4.7.13. Потребление цитрата

Готовят цитратный агар Симмонса (117), который имеет следующий состав: цитрат натрия - 2 г; NaCl - 5 г; $MgSO_4$ - 0,2 г; $NH_4H_2PO_4$ - 1 г; K_2HPO_4 - 1г; бромтимоловый синий - 0,08 г; агар - 15 г; дистиллированная вода - 1000 мл. Компоненты смешивают и доводят pH смеси до 6,9. Кипятят для растворения агара, разливают в пробирки и стерилизуют автоклавированием. Пробирки оставляют после стерилизации в наклонном положении для изготовления косячков.

Готовят разбавленную суспензию микроорганизмов в стерильной воде или физиологическом растворе. Посевной материал наносят штрихом на косяк цитратного агара и инкубируют 7 дней. Положительная реакция - появление голубой окраски, означающей использование цитрата в качестве единственного источника углерода.

Для определения потребления цитрата может быть использован агар Кристенсена (109), имеющий следующий состав: цитрат натрия - 3 г; глюкоза - 0,2 г; дрожжевой экстракт - 0,5 г; цистеин солянокислый - 0,1 г; цитрат железа (II)-аммония - 0,4 г; KH_2PO_4 - 1 г; NaCl - 5 г; тиосульфат

натрия - 0,08 г; феноловый красный - 0,012 г; агар - 15 г; дистиллированная вода - 1000 мл. Компоненты смешивают и доводят pH до 6,7. Стерилизуют автоклавированием. Охлаждают в наклонном положении, так чтобы высота застывшего столбика составляла 2,5 см, а длина скошенной части агара была равна 3,8 см.

Разбавленную суспензию клеток наносят штрихом на всю поверхность косяка и инкубируют 7 дней. Положительная реакция - появление красной окраски или окраски цвета фуксина. Положительная реакция означает использование цитрата, но не обязательно в качестве единственного источника углерода, т.е. организм может давать положительную реакцию на агаре Кристенсена и отрицательную - на цитратном агаре Симмонса.

4.7.14. Потребность в формиате и фумарате

Этот тест применяют для выявления некоторых анаэробов, которые окисляют формиат и попутно восстанавливают фумарат в сукцинат (112). Готовят основной формиатно-фумаратный раствор (Ф - Ф), который имеет следующий состав: формиат натрия - 3 г; фумаровая кислота - 3 г; дистиллированная вода - 50 мл. Компоненты смешивают. Добавляют 20 гранул NaOH, размешивают до растворения этих гранул и фумаровой кислоты. Доводят pH смеси до 7,0, добавляя около 15 капель 4 н NaOH, и стерилизуют фильтрованием. Готовый формиатно-фумаратный раствор добавляют в количестве 1 капли на 1 мл предварительно восстановленного пептонно-дрожжевого бульона PY' (см. разд. 3.4.7) в момент его инокуляции в атмосфере очищенной от кислорода двуокиси углерода. Сравнивают рост на этой среде с ростом на среде без Ф - Ф. Положительная реакция - рост сильно стимулируется Ф - Ф. В некоторых случаях в отсутствие добавок вообще не наблюдается роста.

4.7.15. Определение образования каталазы

Посев проводят на скошенной питательный агар (например МПА) или другую среду, не содержащую крови. После инкубации вливают по капле вниз по косяку 1 мл 3%-ной перекиси водорода. Сразу же и через 5 мин наблюдают за образованием пузырьков, которое означает положительную реакцию. Параллельно добавляют несколько капель 3%- ной перекиси водорода к колониям на чашке или к зонам обильного роста, который может наблюдаться на поверхности полужидкой среды или около нее. В случае бульонной культуры к 0,5 мл культуры добавляют 0,5 мл 3%-ной перекиси водорода и наблюдают за постоянным образованием пузырьков. Не следует применять для теста на каталазу среду, содержащую кровь, так как кровь, если ее предварительно не прогреть, имеет каталазную активность. Некоторые бактерии (например, молочнокислые) в средах с низкими концентрациями глюкозы или вообще без глюкозы образуют негемовую «псевдокаталазу» (121). Образование псевдокаталазы можно предотвратить введением в среду глюкозы (1%).

При проверке анаэробов на каталазную активность важно перед добавлением перекиси водорода выдержать культуру на воздухе в течение 30 мин.

Тест на каталазу может быть поставлен на предметном стекле. Для этого выросшую культуру снимают с поверхности агара неметаллическим инструментом и суспендируют в капле 3%-ной перекиси водорода на стекле. Немедленно и через 5 мин наблюдают за образованием пузырьков визуально или в микроскоп с малым увеличением.

Другой метод применяют для бактерий, способных образовывать каталазу только при росте на среде, содержащей гем, например для некоторых молочнокислых бактерий (121). К стерильной основе кровяного агара, содержащей 1% глюкозы для ингибирования образования псевдокаталазы, добавляют 5% (по объему) смеси дефибринированной крови и стерильной воды (1:1). Среду нагревают при 100^0C в течение 15 мин для инактивации каталазы крови, охлаждают до 45 - 50^0C и разливают по чашкам. Рост проверяют непосредственно в чашках с помощью 3%-ной перекиси водорода или ставят реакцию на предметном стекле.

4.7.16. Определение коагулазы

Полную петлю бактериальной массы, снятой со скошенного агара, 0,1 мл бульонной культуры или одну колонию, снятую с агара в чашке смешивают с 0,5 мл неразведенной плазмы крови кролика или плазмы, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1:4. Инкубируют при 37^0C и наблюдают через 4 и 24 ч. Положительная реакция - образование плотного или рыхлого сгустка, суспендированного в плазме. Гранулированные или вязкие образования положительным результатом не считаются.

4.7.17. Определение оксидазы

На отрезок фильтровальной бумаги наносят несколько капель 1% - ного раствора дигидрохлорида тетраметил-n-фенилендиамина, приготовленного в тот же день. Выросшую культуру снимают с поверхности агаровой среды платиновой петлей (обычные петли из нихромовой проволоки могут дать ложноположительную реакцию) и наносят ее на увлажненную бумагу. Положительная реакция - развитие фиолетовой или пурпурной окраски в течение 10 сек.

Другой метод менее чувствителен, но более удобен. Несколько капель смеси (1:1, по объему) 1%-ного α -нафтола, растворенного в 95%-ном этаноле, и свежеприготовленного 1%-ного водного раствора оксалата диметил-n-фенилендиамина наносят на колонии в чашках с агаром. В другом варианте к жидкой культуре добавляют 0,2 мл α-нафтола и 0,3 мл диметил-n-фенилендиамина и энергично перемешивают. Положительная реакция - окрашивание колоний или бульонной культуры в фиолетово-синий цвет в течение 10 - 30 сек.

4.7.18. Определение липазы

Готовят желточный агар по Холдеману с соавт. (112), имеющий следующий состав: пептон - 20 г; Na_2HPO_4 - 2,5 г; NaCI - 1 г; $MgSO_4$, 0,5%-ный (вес/объем) раствор - 0,1 мл; глюкоза - 1 г; агар - 12,5 г; дистиллированная вода - 500 мл. Компоненты смешивают, pH смеси доводят до 7,3 - 7,4. Смесь кипятят для растворения агара, стерилизуют автоклавированием (112^0C) в течение 20 мин и охлаждают до 60^0C в водяной бане. Скорлупу яйца дезинфицируют спиртом и дают ей обсохнуть. Яйцо разбивают и отделяют желток от белка. Желток с соблюдением правил асептики переносят в расплавленный агар и перемешивают до получения однородной суспензии. Разливают в чашки и оставляют для затвердения. Работая с анаэробными микроорганизмами, чашки используют в течение 4 ч после приготовления или хранят в анаэробном боксе.

Приготовленный агар засевают штрихом. После инкубации снимают крышку чашки и внимательно просматривают поверхность при косом освещении. Положительный результат - образование маслянистого блестящего с переливами или перламутрового слоя над колонией и вокруг нее на поверхности агара.

Для определения гидролиза эфиров пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот используют метод Сайерра (116). Применяют агаровую среду с добавлением 0,01% $CaCl_2 \cdot H_2O$. Стерилизуют твин 40 (эфир пальмитиновой кислоты), твин-60 (эфир стеариновой кислоты) или твин-80 (эфир олеиновой кислоты) автоклавированием при 121^0C в течение 20 мин. Добавляют стерильный твин в расплавленную агаровую среду при 45 - 50^0C до конечной концентрации 1% по объему. Среду встряхивают до полного растворения твина, разливают по чашкам Петри, оставляют до затвердения и засевают штрихом. Положительный результат - появление мутного ореола вокруг колоний. При исследовании под микроскопом видно, что ореолы состоят из кристаллов кальциевого мыла.

При исследовании гидролиза жиров различных типов применяют метод, описанный в руководстве Скермана (118). С этой целью готовят жир нужного типа, окрашенный нильским голубым сернокислым.

Готовят насыщенный водный раствор нильского голубого сернокислого. Добавляют 1 н NaOH по каплям до прекращения образования осадка. Фильтруют и промывают осадок дистиллированной водой при pH 7,5. Высушивают и хранят до использования.

Для окрашивания жиров готовят насыщенный раствор оксазинового основания нильского голубого сернокислого, используя приготовленный ранее сухой осадок. Смешивают 1 мл раствора с 10 мл жира (трипотопионина, трибутирина, трикапроина, трикапрелина, триолеина, говяжьего сала, молочного жира, кокосового, кукурузного, хлопкового масла, свиного жира, льняного или оливкового масла). При необходимости смесь помещают в подогреваемую водяную баню для поддержания жира в жидком состоянии в течение всей последующей процедуры промывания.

При промывании, в случае жиров, находящихся при комнатной температуре в жидком состоянии, к смеси красителя и жира в делительной воронке добавляют 2 объема диэтилового эфира. Эфирный красный слой отделяют от слоя воды и несколько раз промывают его водой. При этом работают очень осторожно, поскольку эфир легко воспламеняется. Все процедуры с эфиром проводят в вытяжном шкафу, избегая огня или искр, в присутствии которых может произойти взрыв. Наконец, отделяют эфирный слой, в котором находится жир, и выпаривают эфир. Отделяют жир от остатков воды, стерилизуют его автоклавированием и хранят в холодильнике. Перед применением добавляют 1 мл окрашенного жира к 10 мл расплавленной стерильной основной среды, хорошо перемешивают и разливают в чашки.

В случае жиров, находящихся при комнатной температуре в твердом состоянии, смесь красителя с жиром промывают несколько раз горячей водой и затем разливают жир в расплавленный нейтральный 0,5%-ный агар - по 10 мл жира на 90 мл агара. Стерилизуют автоклавированием. Перед использованием жир расплавляют и вносят 1 мл жировой эмульсии в 20 мл расплавленной стерильной основной среды.

Подготовленные для посева среды с различными жирами инокулируют штрихом и инкубируют в термостате. Положительная реакция - образование синего ореола вокруг колоний.

Количественное определение липолитической активности микроорганизмов устанавливают титрометрическим методом, основанным на определении свободных жирных кислот, образовавшихся в результате гидролиза липидов. При определении липазной активности чаще всего пользуются реакционной смесью, состоящей из 6,5 мл 1/15 М фосфатно-цитратного буфера, 2,5 мл эмульсии оливкового масла в 1%-ном растворе поливинилового спирта в соотношении 2:3 и 1 мл фильтрата культуральной жидкости. Инкубацию проводят при встряхивании в течение 1 ч при 39^0С. По окончании инкубирования действие фермента прекращают добавлением 15 мл этанола. Полученную смесь титруют раствором 0,05 н КОН в присутствии 1%-ного раствора фенолфталеина. Контрольные образцы готовят так же, но культуральную жидкость вносят после добавления этанола. Результаты титрования контроля вычитают из результатов опыта.

За единицу липазной активности условно принимают 1 мл 0,05 н КОН, пошедшего на титрование жирных кислот, образовавшихся при гидролизе субстрата под действием 1 мл культуральной жидкости в условиях опыта.

4.7.19. Определение уреазы

Для определения образования уреазы микроорганизмами Кристенсеном рекомендован агар с мочевиной (108). Среда имеет следующий состав: пептон - 1 г; глюкоза - 1 г; NaCI - 5 г; KH_2PO_4 - 2 г; феноловый красный - 0,012 г; агар - 20 г; дистиллированная вода - 1000мл; дрожжевой экстракт (не во всех случаях) - 0,1 г. Компоненты смешивают и до-

водят pH до 6,8-6,9. Смесь кипятят для растворения агара и стерилизуют автоклавированием. Охлаждают до 50^0C. Добавляют с соблюдением правил асептики достаточное количество 20%-ного раствора мочевины (стерилизованного фильтрованием) до конечной концентрации 2%. Перемешивают и с соблюдением правил асептики разливают по 2 - 3 мл в стерильные небольшие пробирки. Охлаждают в наклонном положении, при котором высота столбика равна 1,3 см, а длина скошенной части 2,5 см. Скошенный агар инокулируют испытуемыми культурами и инкубируют в термостате. Положительная реакция - появление красно-фиолетовой окраски.

Другой метод используют для микроорганизмов, не растущих на агаре Кристенсена о мочевиной. Готовят раствор, содержащий: 0,1065% БЭС - буфера [N, N - бис - (2 - гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновая кислота; ICN Pharmaceuticals, Cleveland, Ohio], 2% мочевины и 0,001% фенолового красного, pH - 7,0. Стерилизуют фильтрованием и разливают с соблюдением правил асептики по 2 мл в небольшие пробирки. Бульонную культуру центрифугируют и к клеткам добавляют стерильную дистиллированную воду или физиологический раствор для получения густой суспензии. В пробирку со средой, содержащей мочевину, добавляют 0,5 мл клеточной суспензии. Инокулируют также контрольную среду без мочевины. Пробирки инкубируют 24 ч. Положительная реакция - появление красно-фиолетовой окраски.

Отбор культур, образующих уреазу, проводят также на индикаторной среде Блайна и Казки (105). Для приготовления среды берут 2,25 г агара, вносят в 150 мл дистиллированной воды и полученную суспензию нагревают до полного расплавления агара. После охлаждения до 60^0C в раствор добавляют 6 г мочевины, 12 мл 0,04%-ного раствора крезолового красного и 1 мл 0,7%-ного раствора диэтилдитиокарбоната, размешивают и разливают в чашки Петри. На поверхность застывшей среды переносят петлей отдельные колонии испытуемых организмов и в положительном случае спустя 1 - 5 мин вокруг колоний появляются фиолетовые зоны, образующиеся в результате действия аммиака, повышающего pH среды. На одну чашку со средой не рекомендуют переносить более 50 колоний, так как в противном случае цветные зоны сливаются.

При количественном определении уреазной активности чаще всего пользуются реактивом Несслера. В этом случае определение основано на том, что реактив Несслера с аммиаком образует красно-коричневый осадок. При небольших концентрациях аммиака осадок не появляется, а раствор окрашивается в желтый или оранжевый цвет.

Для постановки реакции готовят следующие реактивы: 1) 0,5 М фосфатный буфер, pH 7,0; 2) мочевина - 3%-ный раствор, приготовленный на 0,5 М фосфатном буфере; 3) реактив Несслера (готовый или изготовленный по прописи, представленной в п. 4.7.7); 4) соляная кислота, 1 н раствор; 5) стандартный раствор хлористого или сернокислого аммония, содержащий 50 мкг аммиака в 1 л.

Ход работы. В химически чистые пробирки наливают по 1 мл 3%-ного раствора мочевины и помещают на 1 мин в водяной термостат при 39^0С, после чего добавляют 1 мл суспензии клеток или 1 мл культуральной жидкости и инкубируют в течение 5 мин. Реакцию гидролизного разложения мочевины останавливают добавлением 1 мл 1 н раствора соляной кислоты. В контрольную пробирку, содержащую 1 мл суспензии клеток или 1 мл культуральной жидкости, соляную кислоту добавляют до внесения субстрата. После инкубации к 0,2 мл реакционной смеси приливают 8,8 мл дистиллированной воды и 1 мл реактива Несслера. Оптическую плотность измеряют при помощи фотоэлектроколориметра. Колориметрируют в кюветах с толщиной слоя 10 мм при 490 нм против контрольных проб. Для определения уреазной активности применяют калибровочный график. Для построения калибровочного графика используют 0,2 - 1,0 мл стандартного раствора соответствующей аммонийной соли. Пробы для развития окраски обрабатывают, как указано выше. Результаты фотометрирования изображают графически, откладывая на оси абсцисс количество аммиака в пробе, а на оси ординат - значение оптической плотности.

За единицу уреазной активности принимают количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоля аммиака за 1 мин при 39^0С.

4.7.20. Определение фосфатаз

Определение присутствия как кислой, так и щелочной фосфатаз может быть проведено на питательней среде, обеспечивающей рост тестируемых организмов. Для этого в агаровую ростовую среду, например МПА, расплавленную и охлажденную до 45 - 50^0С, добавляют с соблюдением правил асептики достаточное количество 1%-ного раствора натриевой соли дифосфата фенолфталеина (Sigma), стерилизованного фильтрованием, до конечной концентрации 0,01%. Чашки с инокулированным штрихом агаром инкубируют от 2 до 5 дней. На крышку перевернутой чашки наносят 1 каплю раствора нашатырного спирта (удельный вес 0,880, концентрация 28 - 30%) и вставляют в них перевернутые чашки с культурой для того, чтобы пары аммиака достигли колоний. Положительная реакция - в результате образования свободного фенолфталеина колонии становятся красными.

Бюргер (107) предложил метод для обнаружения только кислой фосфатазы. По этому методу готовят очень густую суспензию клеток в физиологическом растворе (0,85% NaCl). 0,3 мл суспензии добавляют к 0,3 мл раствора субстрата, содержащего 0,1 М цитратный буфер, pH 4,8 и 0,01 М динатрий-n-нитрофенилфосфат (Sigma). Смесь инкубируют 6 ч при 37^0С. Затем добавляют 0,3 мл 0,04 М глицинового буфера, pH которого доводят до 10,5 с помощью NaOH. Ставят также контрольные пробы без бактерий. Положительная реакция - появление желтой окраски, свидетельствующей об активности кислой фосфатазы.

Аналогичным образом по методу Бюргера (107) может быть продемонстрировано наличие только щелочной фосфатазы. Постановка ре-

акции совпадает с описанной выше для кислой фосфатазы с той лишь разницей, что n-нитрофенилфосфат растворяют не в цитратном, а в глициновом буфере. Для развития желтой окраски добавления глицинового буфера не требуется.

4.7.21. Определение ацетилметилкарбинола

Реакцию Фогес-Проскауера ставят на культурах, выращенных в предвосстановленном пептонно-дрожжевом бульоне PY (п. 4.7.), к которому добавляют 1% глюкозы. 48-часовую культуру в объеме 1 мл переносят в чистую пробирку, добавляют 0,6 мл 5%-ного (вес/объем) α-нафтола, растворенного в 95%-ном этиловом спирте, и тщательно перемешивают. Затем добавляют 0,2 мл 40%-ного водного раствора KOH. Вновь хорошо перемешивают и инкубируют, установив пробирку наклонно для увеличения площади поверхности среды (реакция зависит от доступа кислорода). Пробирку просматривают через 15 и 60 мин. Положительная реакция - окрашивание поверхности среды в интенсивный красный цвет.

4.7.22. Толерантность к желчи

Готовят желчный агар (110) по следующей прописи: экстракт из говяжьего мяса - 10 г; пептон - 10 г; NaCl - 5 г; дистиллированная вода - 1000 мл.

Компоненты смешивают и растворяют при нагревании. Доводят pH до 8,0 - 8,4 добавлением 10 н NaOH. Кипятят 10 мин, фильтруют, доводят pH до 7,2 - 7,4 и добавляют 10 г дегидратированной бычьей желчи [1% дегидратированной бычьей желчи = 10% (по объему) жидкой желчи; для получения 40%-ного агара с желчью берут 4% дегидратированной бычьей желчи]. При необходимости вновь доводят pH до 7,2 - 7,4. Добавляют 15 г агара, кипятят и стерилизуют автоклавированием (121^0C - 20 мин). Охлаждают до 55^0C и добавляют с соблюдением правил асептики 50 мл стерильной сыворотки крови. Перемешивают и разливают в чашки Петри.

Застывший желчный агар инокулируют штрихами (контроль - среда без желчи) и наблюдают за ростом испытуемых культур.

Исследование анаэробов проводят по методу Холдемана с соавт. (112). Инокулируют предварительно восстановленный пептонно-дрожжевой бульон PY (разд. 4.7), содержащий 1% глюкозы и 2 или 4% бычьей желчи, с помощью пастеровской пипетки, пропуская через бульон очищенную от кислорода двуокись углерода. Закрывают пробирки пробками и инкубируют в термостате. Наблюдают за ростом и сравнивают его с ростом на среде, не содержащей бычьей желчи.

Представленные выше методы исследования не охватывают всего разнообразия физиолого-биохимических тестов, используемых при изучении свойств микроорганизмов, но с учетом морфологии колоний и

клеток, культуральных характеристик организмов обычно достаточны для их идентификации. При необходимости углубленного изучения вновь выделенных культур прекрасным руководством может быть трехтомник "Методы общей бактериологии" под редакцией Герхардта и других, изданный в русском переводе (19), а для анаэробов руководство Холдемана и др. (121).

4.8. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ РУБЦА ЖВАЧНЫХ

(ПОСОБИЕ ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ)

Одним из важнейших этапов в работе с микроорганизмами является изучение их основных свойств. Это необходимо прежде всего для того, чтобы выяснить функциональную роль того или иного микроорганизма в процессах ферментации кормов в пищеварительном тракте животных, а также с целью определения их таксономического положения. Идентификация микроорганизмов обычно проводится с помощью определителей, в которых с различной степенью полноты представлены описания микробных видов, родов, семейств, порядков и других высших таксонов.

Следует отметить, что отечественные определители микробов Циона и Красильникова не содержат информации об облигатных анаэробах рубца жвачных, они давно не переиздавались и поэтому значительно устарели. Описание некоторых видов рубцовых бактерий включено в 7-е издание определителя микроорганизмов Берги, который вышел в свет в 1957 году. В 1974 году было опубликовано 8-е издание этого определителя, которое в настоящее время является лучшим. Заварзин (23), например, считает, что "...пока никто не может противопоставить Берги-8 что-либо более полное и логичное". В равной мере это относится и к информации о микроорганизмах рубца. Однако Берги-8 издан в нашей стране в сокращенном виде и не содержит информации об отдельных видах бактерий рубца (26).

Распыленность информации о микроорганизмах рубца по периодическим и продолжающимся изданиям и ограниченная доступность оригинального издания Берги-8 побудили нас включить в настоящее пособие описание свойств основных родов и видов анаэробных микроорганизмов рубца что, по нашему мнению, значительно облегчит работу по идентификации. Представленные здесь описания микроорганизмов являются извлечениями из журнальных статей, монографии Хангейта (160) и определителя Берги-8 (127).

4.8.1. Целлюлозолитические микроорганизмы рубца жвачных

Известно, что целлюлоза служит главным структурным компонентом клеточных стенок растений. В стенках всех растительных клеток окружающие клетку целлюлозные волокна имеют правильную, почти кристаллическую упаковку. Эти волокна цементируются матриксом, со-

стоящим из трех других полимерных материалов: гемицеллюлозы, пектина и экстенсина. Главными компонентами матрикса являются гемицеллюлозы, в структурном отношении не похожие на целлюлозу. Они являются D-ксиланами-полимерами D-ксилозы, структурные единицы в молекулах которых соединены β $(1 \rightarrow 4)$ связями, а роль боковых цепей играют остатки арабинозы и других сахаров. Пектин является полимером метил-D-галактуроната, а экстенсин - белком, ковалентно связанным с целлюлозными волокнами. Экстенсин в некоторых отношениях напоминает коллаген и как последний отличается высоким содержанием оксипролина.

В эту физиологическую группу входят бактерии, занимающие различное таксономическое положение и значительно отличающиеся как по морфологии, так и по биологическим свойствам. Она включает бактерии из родов Ruminococcus, Bacteroides, Butyrivibrio, Clostridium и Eubacterium, описание которых и приводится ниже.

4.8.1.1. Род Ruminococcus, Sijpesteijn, 1948 (178)

В этот род включены сферические до удлиненных, кокковидные клетки. Когда клетки удлинены, их концы закруглены или сплющены. Встречаются в виде отдельных клеток, попарно или в коротких цепочках, состоящих из 3 - 4 клеток (R. albus) или в цепочках, содержащих 8-50 или более клеток (R. flavefaciens) Средний диаметр клеток варьирует в пределах 0,7 - 1,2 мкм. Окрашиваются грампозитивно, но относительно легко могут обесцвечиваться. В молодых культурах у всех штаммов некоторые клетки содержат иодофильный резервный полисахарид (глюкозный полимер), который может быстро исчезать в стационарной фазе роста. Клетки неподвижны, эндоспор не имеют.

Поверхностные колонии на глюкозно-целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью (RGCA) после 3 дней инкубации (посев методом «roll-tube») выглядят цельными, гладкими и незначительно выпуклыми. В проходящем свете они варьируют от просвечивающихся до непрозрачных, иногда флуоресцируют или имеют внешний вид «заиндевевшего стекла». Колонии могут быть белыми, рыжевато-коричневыми или желтыми до оранжевых, диаметром обычно 2 - 4 мм. Колонии, растущие в глубине среды, имеют форму двояковыпуклой линзы.

Целлюлоза обычно переваривается, и в среде, содержащей избыток целлюлозы, накапливается редуцирующий сахар. Целлобиоза ферментируется всегда. Ксилан ферментируют приблизительно 85% штаммов. Отдельные штаммы могут не ферментировать каких-либо других сахаров, но могут сбраживать один или несколько из следующих углеводов: глюкозу, D-ксилозу, эскулин, фруктозу, сахарозу, лактозу и L-арабинозу. Из других углеводов кислоты не образуюся.

В среде, содержащей бикарбонат и насыщенный CO_2, при ферментации целлобиозы главными продуктами являются уксусная и муравьиная кислоты. Этанол и/или янтарная кислота также могут быть главными продуктами метаболизма, но когда главным продуктом является этанол,

образуется больше водорода и немного или совсем не образуется янтарной кислоты (R. albus). Когда главным продуктом ферментации является сукцинат, образуется много водорода, а этанол отсутствует или находится в следовых количествах (R. flavefaciens). Молочная кислота, если продуцируется, то обычно в небольших количествах. Метан и жирные кислоты, содержащие три или более углеродных атомов, не образуются. При продукции сукцината наблюдается фиксация CO_2. Микроорганизмы, занимающие промежуточное положение между R. albus и R. flavefaciens по цвету колоний, морфологии и продуктам метаболизма, также выделены (65).

Руминококки являются хемоорганотрофами и пищевые потребности их могут быть сложными (124 - 125). Рубцовая жидкость или фекальный экстракт могут быть необходимы для роста в обычных средах (65), однако более половины штаммов может расти в средах, содержащих витамины группы В, целлобиозу, минеральные соли, аммоний, сульфид, CO_2, ацетат и одну или несколько кислот с разветвленной цепью: изовалериат, изобутират и 2-метил-бутират.

Главным источником азота для всех изученных штаммов является аммоний. Экзогенный аминокислотный углерод и азот используются очень плохо, хотя некоторые штаммы нуждаются в метионине или витамине B_{12} (122, 123, 138, 139,147).

Рост в целлобиозном бульоне с рубцовой жидкостью характеризуется равномерным помутнением в течение одних суток. Микроорганизмы хорошо растут при температуре в пределах 30 - 37^{0}С и не растут при 15 и 50^{0}С. Некоторые штаммы растут при 22 и 45^{0}С.

Каталазу, индол и сероводород не образуют. Крахмал не гидролизуют, нитраты не редуцируют. Аммиак из аминокислот или пептидов не образуют. Реакция Фогес-Проскауэра вариабельна, и очень немногие штаммы разжижают желатину.

Микроорганизмы строго анаэробны и для успешного их выделения необходимо использовать анаэробную технику Хангейта (88) или подобный строго анаэробный метод. Первоначальный pH среды в пределах 6,0 - 7,0 благоприятствует росту, а pH около 6,5 является оптимальным.

Имеется множество серологических типов (157). Выделены из рубца крупного рогатого скота и овец, из слепой кишки кроликов и морских свинок. Вероятно, широко распространены в рубце жвачных, слепой и толстых кишках травоядных и, по-видимому, играют важную роль в ферментации клетчатки в этих органах. Содержание Г+Ц в ДНК варьирует в пределах 39,8 - 45,4 моль% (Tm).

Типовой вид: Ruminococcus flavefaciens, Sijpesteijn, 1948 (178).

4.8.1.1.1. Ruminococcus flavefaciens, Sijpesteijn, 1948 (178)

Обычно является сферическим, иодофильным стрептококком, длина цепочек которого варьирует в зависимости от условий культивирования. Цепочки могут состоять из 8 - 50 или более клеток, имеющих

средний диаметр 0,8 - 0,9 мкм. Некоторые штаммы оказались грамнегативными, другие грамвариабельными. Электронная микроскопия тонких срезов клеток демонстрирует грампозитивную анатомию. В целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью диаметр колоний после 3-дневной инкубации достигает 2 - 4 мм, а пигментация варьирует от типичной желтой или оранжевой до белой (редко).

Конечный pH в целлобиозном бульоне 5,0 - 5,6. При посеве в глубину целлобиозного агара образования газовых трещин не наблюдается, но продуцируется небольшое количество водорода (161). Ксилан обычно ферментируется; глюкоза и D-ксилоза, как правило, не сбраживаются; L-арабиноза, декстрин, эскулин, фруктоза, глицерол, гуммиарабик, инулин, лактоза, мальтоза, маннитол, салицин и сахароза не ферментируются (136). По измерению Tm у семи штаммов (176) содержание Г+Ц в ДНК составляет 39,8 - 43,5 моль%. Обнаружен в рубце крупного рогатого скота и овец, слепой и ободочной кишках кроликов и других органах травоядных.

4.8.1.1.2. Ruminococcus albus, Hungate, 1957 (65)

Клетки кокковидные, 0,8 - 2,0 мкм в диаметре. Располагаются единично, парами и в коротких цепочках. Никогда не встречается в тетрадах или кубических пакетах. Перед делением незначительно удлиняются. Отношение к окраске по Граму варьирует от грамнегативной до грамвариабельной. Часто клетки капсулированы, иодофильны. В первоначальном описании указывалось, что вид был обычно неидофильным (65), но позднее это было уточнено (156, 136). Колонии преимущественно белые, но встречаются с разной степенью пигментации. Поверхностные колонии на целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью круглые и выпуклые, а колонии, растущие в глубине среды, обычно имеют форму линзы, но могут быть и более сложной формы.

Окончательный pH в целлобиозной среде 5,1 - 5,6. Большинство штаммов ферментирует целлюлозу и ксилан. Фруктоза, глюкоза, лактоза и манноза сбраживаются некоторыми штаммами, а L-арабиноза, декстрин, эскулин, галактоза, глицерол, инулин, лактат, мальтоза, маннитол, раффиноза, сахароза, трегалоза и ксилоза не ферментируются. При ферментации целлюлозы увеличивается образование CO_2, H_2, ацетата и этанола и уменьшается лактата, по сравнению с продуктами, образуемыми из целлобиозы (88). Содержание Г+Ц в ДНК варьирует в пределах 42,6 - 45,4 моль% (Tm). Этот вид целлюлозолитических кокков обнаружен в больших количествах в рубце крупного рогатого скота и овец.

4.8.1.2. Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes, Hungate, 1950 (88)

Этот микроорганизм является грамнегативной палочкой, имеющей размеры 0,3 - 0,4×1 - 2 мкм в случае культивирования на целлюлозном агаре. В целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью клетки несколько

длиннее, полулунной формы и часто демонстрируют более интенсивное окрашивание на полюсах клеток (88), или могут иметь форму лимона. Старые клетки набухают и легко лизируются.

Своеобразный рост наблюдается на целлюлозном агаре. Отдельных колоний не образуется. Клетки мигрируют через агар и скапливаются по периферии зоны просветления в непосредственной близости к не переваренной целлюлозе (88). В центре просветления находятся слабо окрашиваемые овальные клетки, которые, по-видимому, являются дегенеративными стадиями вегетативных клеток. В старых колониях видны только эти тени клеток. Центральная часть старых колоний не дает роста при пересеве в свежую среду, на основании чего было сделано заключение, что сферические формы являются нежизнеспособными.

Поверхностные колонии на глюкозно-целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью (RGCA) при посеве методом «roll tube» выглядят целыми, незначительно выпуклыми, от просвечивающих до непрозрачных, непигментированными или иногда желтыми. Часто они имеют внешний вид «заиндевевшего стекла». Колонии, растущие в глубине среды, имеют диаметр в пределах 1 - 3 мм и форму двояковыпуклой линзы.

В глюкозном бульоне культуры дают помутнение с равномерным осадком. Бульон в старых культурах просветляется, так как клетки лизируются. Конечный pH в глюкозном бульоне достигает 5,5.

Тот факт, что B. succinogenes способна мигрировать через агар, по мнению Хангейта (88), свидетельствует о ее родственности микобактериям. Это подтверждается подобием продуктов ферментации у Cytophaga succinogenes и Cytophaga fermentans за исключением того, что последняя декарбоксилирует янтарную кислоту до пропионата.

Когда культуры B. succinogenes при первичном выделении получены из пробирок с целлюлозным агаром, они часто загрязнены спирохетами из рода Borrelia (130). Оба организма способны проходить через агар. Borrelia накапливаются в той же самой зоне, что и B. succinogenes, поскольку здесь имеется наивысшая концентрация сахара, образующегося при переваривании целлюлозы. Поэтому получить чистую культуру B. succinogenes из такой смешанной культуры путем пересевов на целлюлозном агаре невозможно. Первичное выделение культур на сахарной среде обычно устраняет это препятствие.

В дополнение к целлюлозе штаммы B. succinogenes ферментируют глюкозу и целлобиозу. Пектин и крахмал ферментируются некоторыми штаммами, тогда как ксиланы не ферментируются. Могут сбраживаться один или несколько из следующих углеводов: мальтоза, крахмал, трегалоза и лактоза. Рост на сахаре быстрый и колонии появляются через 24 часа.

Оптимальная температура для роста около 40^0C. Хороший рост наблюдается в глюкозной среде при 30 - 38^0C и отсутствует при 22 и 45^0C. Растет в глюкозной среде с первоначальным pH 6,05 - 7,7 и не дает роста при pH 5,5 (131).

Потребность B. succinogenes в смеси жирных кислот с прямой и разветвленной цепью была обнаружена Брайнтом (131). Кислотами с прямой цепочкой могут быть 5 - 8-углеродные, а также 14, 15= или 16= углеродные (183), а кислотами с разветвленной цепью могут быть изомасляная или 2-метил-масляная. Эти кислоты встречаются в рубцовой жидкости в невысоких концентрациях и, как установлено, являются результатом ферментации некоторых аминокислот.

Из других веществ B. succinogenes нуждается в биотине, парааминобензойной кислоте, аммонии и сульфиде или цистеине. Хороший рост и переваривание целлюлозы наблюдается в среде, содержащей только целлюлозу, парааминобензойную кислоту, биотин, цистеин, аланин, фенилаланин, валериат, изобутират, бикарбонатно-капроновокислый буфер, резазурин и минеральные соли (137). Потребность в аммонии является строгой, поскольку проявляется даже в присутствии многих аминокислот.

Главными продуктами метаболизма являются уксусная и янтарная кислоты с варьирующими количествами муравьиной кислоты (88). При ферментации целлюлозы и целлобиозы культуры используют CO_2, который предположительно, включается в карбоксильную группу сукцината. Они не могут хорошо расти, если среда не обеспечена углекислым газом. При ферментации целлюлозы наиболее важным продуктом является янтарная кислота.

B. succinogenes выделена из рубцового содержимого крупного рогатого скота, овец и некоторых диких африканских антилоп. По-видимому, она является одним из многочисленных видов среди преобладающих бактерий в рубце у большинства жвачных.

4.8.1.3. Род Butyrivibrio, Bryant a. Small, 1956 (132)

Изогнутые палочки располагаются единично, цепочками или нитями, которые иногда могут быть спиральными. Подвижны, обладают монотрихоидными полярными или субполярными жгутиками. Стадии покоя неизвестны. Палочки - грамнегативны.

Хемоорганотрофы. Метаболизм - ферментативный. Главными ферментируемыми субстратами являются углеводы. Глюкоза сбраживается с образованием масляной кислоты в качестве одного из важнейших продуктов. Некоторые штаммы при определенных условиях культивирования образуют много молочной кислоты и немного масляной (150, 162). Строгие анаэробы. Типовой вид: Butyrivibrio fibrisolvens, Bryant a. Small, 1956 (132).

Представители этого рода составляют одну из наиболее многочисленных и биохимически многосторонних групп бактерий, обитающих в рубце, но среди включенных в род штаммов наблюдаются значительные различия. Последние проявляются в источниках энергии и продуктах ферментации (132, 175), серологии (164) и питании (141, 175). Имеется сообщение о нескольких неподвижных штаммах. Хангейт назвал новый вид Butyrivibrio alactacidigenes (89), который он выделил из B. fi-

brisolvens, так как первый не образовывал лактата. Шен и соавт. (175) поместили большинство штаммов в две группы. Одна из них образовывала заметные количества лактата, немного муравьиной кислоты и в процессе ферментации целлобиозы использовала ацетат из среды. Культуры второй группы образовывали ацетат, большие количества муравьиной кислоты и очень немного или совсем не продуцировали лактата. Последняя группа была более требовательна к условиям питания. Однако по ряду других свойств штаммы обеих групп сильно различались, а культуры второй группы, продуцирующие немного лактата или не образующие его, обычно сильно отличались от штаммов Хангейта, которые молочную кислоту не образовывали. Таким образом, до проведения окончательных и тщательных исследований выделение более одного вида в этом роде представляется нецелесообразным.

4.8.1.3.1. Butyrivibrio fibrisolvens, Bryant a. Small, 1956 (132)

Изогнутые палочки размером 0,3 - 0,8×1 - 5 мкм с заостренными или закругленными концами. Некоторые штаммы почти прямые, другие имеют тупозаостренные концы и почти веретенообразную форму. Клетки встречаются единично, в парах и цепочках. Часто видны длинные цепочки и нити. Иногда цепочки демонстрируют спиральное устройство. Подвижность быстрая, вибрирующая, прогрессивная и наблюдается только у немногих клеток. Сообщено также о некоторых неподвижных и безжгутиковых штаммах.

В глюкозно-целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью поверхностные колонии обычно гладкие, целые, слегка выпуклые, просвечивающие, бледно-рыжевато-коричневого цвета, 2 - 4 мм в диаметре. Некоторые штаммы имеют шероховатые колонии, которые выглядят более плоскими, бледнее по цвету и имеют нитевидные края. Колонии, растущие в глубине агара, обычно имеют форму двояковыпуклой линзы или форму трехлучевой звездочки. Встречаются также сложные колонии, состоящие из нескольких двояковыпуклых линз.

В целлюлозном агаре колонии целлюлозолитических штаммов варьируют от простых чечевицеобразных до триангулярных и сложных, состоящих из двояковыпуклых линз. Некоторые штаммы образуют разветвленные ризоидальные колонии. Зоны переваривания целлюлозы вокруг колоний варьируют от очень узких с замедленным и нечетким перевариванием до широких зон с быстрым и полным гидролизом целлюлозы. Рост в жидкой среде с глюкозой варьирует от хлопьевидного до зернистого осадков, которые могут прилипать к стенке пробирки, и до равномерного помутнения. Энергетический метаболизм ферментативного типа. Глюкоза сбраживается с образованием масляной, муравьиной и молочной кислот, H_2 и CO_2. Уксусная кислота может продуцироваться или использоваться. При некоторых условиях культивирования образование молочной кислоты может быть увеличено, а продукция масляной кислоты уменьшена (150). Может накапливаться небольшое

количество этанола и пропионовой кислоты, тогда как янтарная кислота не образуется.

Палочки ферментируют D-ксилозу, фруктозу, глюкозу, целлобиозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, эскулин, салицин и инулин. Часто сбраживаются трегалоза, декстрин, пектин, крахмал и ксилан. Гуммиарабик, глицерол, инозитол, маннитол и лактат не ферментируются. Целлюлоза разрушается некоторыми штаммами, но обычно не сбраживается культурами, выделенными с использованием среды без целлюлозы в качестве источника энергии. Индол и катализа не образуются. Нитраты обычно не редуцируются. Образование сероводорода, ацетоина и разжижение желатины - непостоянны. Питательные потребности - вариабельны. Многие штаммы хорошо растут в средах, содержащих глюкозу, минеральные соли, витамины группы В, цистеин или сульфид, и с аммонием в качестве главного источника азота. Аминокислоты, ацетат и некоторые другие летучие жирные кислоты могут быть стимуляторами роста, а аммоний незаменим для некоторых штаммов (141, 150). Хороший рост наблюдается при 30 и 37^0С и обычно при 45^0С. При 22 и 50^0С рост отсутствует. Окончательный pH в недостаточно забуференной среде с глюкозой обычно составляет 5,0 - 5,6, а у некоторых штаммов ниже 4,6.

Обнаружены в рубце большинства видов жвачных. Близкородственные, если не идентичные, виды присутствуют в пищеварительном тракте других млекопитающих (129)'.

Типовой штамм: Д1[*] , АТСС[**] 19171.

4.8.1.4.Cillobacterium cellulosolvens, Bryant e. a., 1958 (136), Eubacterium cellulosolvens, Holdeman a. Moore, 1972 (112)

Эта бактерия является анаэробной, грампозитивной, подвижной, обладающей перитрихиальными жгутиками палочкой. Впервые она была обнаружена у животного, выпасающегося на клевере, а позднее Хангейт выделил ее от коровы, получавшей рацион из люцернового сена. Ее количество в содержимом рубца варьирует в пределах 1 - 5×10^8/мл.

Эти бактерии представляют значительный интерес, так как главным продуктом ферментации целлюлозы является молочная кислота (>90%). Исходя из этого, они должны бы быть включены в род Lactobacillus . Однако, как было показано ван Гилсвик и Хоффман (180), некоторые подобные штаммы образуют масляную и валериановую кислоты. Последние авторы предложили видовое описание бактерий исправить с тем, чтобы включить микроорганизмы, образующие небольшие количества масляной и валериановой кислот. Таким образом, Cillobacterium cellulosolvens была помещена в род Eubacterium.

[*] D - Medical Research Council Microbial Systematics Unit Collection, Leicester University, Leicester, LEITFRH England.

[**] ATCC - Американская типовая коллекция культур 12301 Parklawn Drive, Rockwille, Md. 20852 USA.

Поверхностные колонии этого вида достигают 3 - 5 мм в диаметре и выглядят круглыми, целыми, от плоских до слегка выпуклых, просвечивающими, рыжевато-коричневого цвета. Колонии, растущие в глубине среды, имеют форму двояковыпуклой линзы. При росте в глюкозном бульоне культуры дают помутнение с образованием равномерного осадка. Конечный pH культуральной жидкости 5,4 - 5,8. Ферментируют целлюлозу, целлобиозу, эскулин, галактозу, глюкозу, инулин, мальтозу, раффинозу, салицин и сахарозу. Слабо сбраживают амигдалин, фруктозу и лактозу. Пектин ферментируют некоторые штаммы. Ксилан обычно не гидролизуют или слабо сбраживают. Декстрин и гуммиарабик не ферментируют.

Наиболее быстрый рост наблюдается при 37 - 39^{0}C, слабый при 45^{0}C и рост отсутствует при 22^{0}C. Выделены из содержимого рубца овец и коров. Типовой штамм: Bryant B_3 48.

4.8.1.5. Спорообразующие целлюлозолитические палочки

4.8.1.5.1. Clostridium cellobioparum, Hungate, 1944 (155)

Прямые палочки размером 0,5 - 0,6×1,4 - 3,3 мкм, грамнегативны. Подвижны, обладают перитрихиальными жгутиками. Споры овальные до сферических, располагаются терминально. Клеточная стенка не содержит диаминопимелиновой кислоты. Поверхностные колонии круглые 0,5 - 1,5 мм в диаметре, с цельными краями, выпуклые, непрозрачные, от кремово-белых до желтоватых с глянцевой поверхностью. В питательном бульоне без ферментируемых углеводов рост слабый, тогда как с углеводами рост обильный. Осадок тягучий.

Ферментируют глюкозу, рибозу, мальтозу, маннозу, целлюлозу и слабо - маннит и лактозу. Продукты метаболизма включают уксусную кислоту. Ацетилметилкарбинол не образуется или образуется в малых количествах. Индол не образуется, молоко не изменяется.

Оптимальная температура для роста 30 - 37^{0}C. Не растет при 25 и 45^{0}C. Содержание Г+Ц в ДНК - 25 моль%. Обнаружены в рубцовом содержимом. Типовой штамм: ATCC 15832; NCIB* 10669.

4.8.1.5.2. Clostridium lochheadii

Впервые был обнаружен Хангейтом в 1957 году (189) у группы коров, которых использовали при изучении влияния соли на поедаемость концентратов, в количестве 4×10^6/мл рубцового содержимого.

Морфология этого микроорганизма довольно характерна. Вокруг колоний в целлюлозном агаре наблюдаются зоны просветления целлюлозы шириной 1 - 2 мм. Если рост достигает поверхности, то клетки быстро распространяются и переваривают целлюлозу в тонком слое, лежащем в основе роста. Подвижные концы колонии могут образовывать

* NCIB - Национальная коллекция промышленных бактерий Torry Research Station, P.O. Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB98DG, Scotland.

пальцеобразные вытягивания. Сами колонии имеют неправильную форму. Их середина обычно менее плотная, чем периферия, и содержит очень немного вегетативных клеток. Когда колония растет, споры в центре ее исчезают и в изобилии обнаруживаются в тонкой периферической оболочке, лежащей в основе вегетативных клеток на поверхности. После культивирования и пересевов штаммов этого вида в лаборатории в течение года или двух, споры становились все менее и менее заметными. Все штаммы, в конечном счете, переставали образовывать споры и не давали роста при пересевах. Однако не установлено, то ли споры преждевременно прорастают, то ли они перевариваются энзимами.

Некоторые из изученных штаммов образовывали очень сильную протеиназу. Лакмусовое молоко полностью пептонизировалось в течение 48 ч после посева. В просветляющейся жидкости обнаруживалось очень немного бактериальных клеток.

Вегетативные клетки этого вида широко варьируют в диаметре. Большие вегетативные клетки имеют диаметр 0,7 мкм и длину 7 мкм. Они, по-видимому, являются предшественниками веретенообразных гигантских клеток, внутри которых находятся сформировавшиеся споры. Клостридиальные формы имеют размеры 1,2 - 1,7×7 мкм, а C. lochheadii является наиболее быстрым разрушителем целлюлозы, выделенным из рубца, хотя некоторые штаммы B. succinogenes и руминококков разрушают ее также быстро. Когда кусочек агара из старой, с нежизнеспособными бактериями культуральной пробирки, в которой вся целлюлоза была переварена, переносили в свежую пробирку с целлюлозным агаром, вокруг агарового кусочка иногда наблюдалось переваривание целлюлозы, которое было обусловлено содержащейся в последнем целлюлазой. C. lochheadii не нуждается для роста в рубцовой жидкости и хорошо растет на экстрактах из сена или смесей кормов для жвачных. Исследованные культуры переваривают 22 - 50% (в среднем 40%) нерастворимых компонентов люцернового и травяного сена.

Ферментируемыми углеводами являются: глюкоза, целлобиоза, мальтоза, сахароза, крахмал, салицин и целлюлоза. Из 8 штаммов 4 сбраживали фруктозу, а один из 6 штаммов ферментировал L-ксилозу, и один - глицерол. D-ксилоза, L-арабиноза, D-арабиноза, галактоза, манноза, рамноза, трегалоза, лактоза, раффиноза, инулин и эскулин не сбраживаются.

На средах с дисахаридами C. lochheadii образует так много липкого вещества, что жидкая среда с 0,5% сахара при перевертывании пробирки иногда не выливается. Культуры погибают при контакте с кислородом, хотя не установлено, на что он действует: то ли на споры, то ли на вегетативные клетки.

Относительные количества продуктов ферментации в чистых культурах следующие: CO_2 - 2,55; водород - 2,76; уксусная кислота - 0,92; муравьиная кислота - 0,52; масляная кислота - 0,87 и этанол - 0,54. Водород и углекислота способствуют развитию в культуральных пробирках

значительного давления. Образуется немного янтарной или молочной кислоты.

4.8.1.5.3. Clostridium longisporum

Этот вид микроорганизмов впервые наблюдался Хангейтом (89). Он был найден у тех же животных, у которых клетки C. lochheadii обнаруживались в больших количествах. Этот вид представлен грамположительными палочками, образующими пигмент от желтого до блестяще-оранжевого цвета, что делает его легко узнаваемым. В рубце у коров джерсейской породы, получавших рацион из люцернового сена, количество палочек достигало 10^5/мл содержимого.

В дополнение к цвету колоний, морфология клеток и спор является весьма характерной. Вегетативные клетки даже более вариабельны в размерах, чем таковые C. lochheadii. Большие вегетативные клетки имеют 1 мкм в диаметре и 7 - 15 мкм в длину. Они расширяются в клостридиальные клетки, достигающие 2 - 3 мкм в диаметре, в которых формируются длинные, иногда незначительно изогнутые споры, имеющие 1 мкм в диаметре при длине 3 - 6 мкм.

Штаммы C. longisporum также оказалось трудно поддерживать в чистой культуре, хотя при редких пересевах культур в целлюлозном агаре некоторые из них удавалось сохранить в течение нескольких лет. Эти микроорганизмы переваривают целлюлозу так же полно, но не так быстро, как клостридии вида C. lochheadii. При росте в сахарном бульоне C. longisporum образует много липкого вещества.

Рубцовая жидкость не является необходимой в качестве питательного вещества. При наличии в среде углевода рост поддерживают питательный бульон и дрожжевой экстракт. Главными продуктами ферментации являются водород, CO_2, уксусная кислота, муравьиная кислота и этанол. Масляная, пропионовая, молочная или янтарная кислоты при первичном выделении не обнаружены. Штаммы, полученные впоследствии, продуцируют также пропионат.

4.8.2. Бактерии рубца, гидролизующие гемицеллюлозу и пектин

Гемицеллюлоза (D-ксилан) составляет большой процент в грубых кормах, поедаемых жвачными. Она нерастворима в воде, но растворяется в растворах кислот и щелочей и переваривается в рубце приблизительно в таком же количестве, как и целлюлоза. Чистая гемицеллюлоза переваривается в рубце почти полностью, а экстракты рубцового содержимого гидролизуют ксилан с образованием редуцирующих сахаров, включая ксилозу.

Ксилан гидролизуется штаммами Eubacterium, Bacteroides ruminicola, Bacteroides amylogenes, Butyrivibrio fibrisolvens, R. flavefaciens, R. albus. Из этого перечня бактерий видно, что способность переваривать гемицеллюлозу является характерной для целлюлозолитических бактерий.

4.8.2.1. Bacteroides ruminicola, Bryant, Small, Bouma and Chu, 1958 (135)

Эта бактерия является грамнегативной, неподвижной палочкой 0,8 - 1 мкм шириной и 0,8 - 30 мкм длиной со слабозаостренными или закругленными концами. Большая часть клеток имеет длину 1,2 - 6 мкм. Около половины клеток являются овальными, а у некоторых клеток видны беспорядочные гранулы и биполярное окрашивание. В старых культурах клетки иногда разбухают и лизируются. Часто клетки инкапсулированы. Располагаются единично, попарно, а также цепочками. Колонии, растущие в глубине среды, после 3-дневной инкубации имеют вид двояковыпуклой линзы, диаметром 2 - 4 мм. Поверхностные колонии достигают в диаметре 1 - 2 мм и выглядят цельными, гладкими, выпуклыми, от прозрачных до светонепроницаемых, цвета буйволиной кожи. Колонии некоторых штаммов при просмотре в отраженном свете имеют внешний вид "заиндевевшего" стекла.

Рост в глюкозном бульоне проявляется помутнением с образованием слизистого осадка. Конечный pH в глюкозном бульоне 4,6 - 5,7. Строгий анаэроб. Рост наблюдается при 30 и 37^0C, но отсутствует при 22 и 45^0C. Большинство штаммов растет при pH 8,5.

Продукты метаболизма, образуемые в глюкозной среде, включают янтарную, муравьиную и уксусную кислоты. Газ не образуется. Ферментирует ксилозу, арабинозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, лактозу, целлобиозу, мальтозу, сахарозу, декстрин, инулин, ксилан, салицин, пектин и эскулин. Не ферментирует лактат, трегалозу, целлюлозу, глицерол, маннитол, инозитол и гуммиарабик. Гидролизует крахмал.

Нитраты не редуцирует. Ацетилметилкарбинол, H_2S , каталазу и индол не образует. Желатину разжижает.

Большинство штаммов хорошо растет в среде, содержащей глюкозу, CO_2, минеральные соли, гем, витамины группы B, некоторые летучие жирные кислоты, метионин и цистеин (141, 170). Главным источником азота является аммиак или пептиды, но не свободные аминокислоты, а метионин и цистеин обычно необходимы и стимулируют рост некоторых штаммов. Для роста большинства штаммов также необходимы гем или тетрапиррол (143). Ацетат, 2-метил-бутират или изомасляная кислота, в особенности когда среда не содержит пептидов, а для некоторых штаммов изомасляная кислота - необходимы (146). Содержит цитохром типа B. Из пептидов образует аммиак. Выделены из преджелудков крупного рогатого скота, овец и лося и предположительно могут быть среди наиболее многочисленных бактерий в рубце.

Брайнт и соавт.(135) подразделили вид B. ruminicola на два подвида: Bacteroides ruminicola subsp. ruminicola и Bacteroides ruminicola subsp. brevis. Кроме того, в первом подвиде описано 8 биотипов, а во втором подвиде - три биотипа. Основные свойства биотипов каждого подвида представлены в таблице 4.8.2.1.

Таблица 4.8.2.1.

Свойства подвидов и биотипов B. ruminicola (135)

Биотип	B. ruminicola subsp. ruminicola								B. ruminicola subsp. brevis		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Разжижение желатины	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Гидролиз крахмала	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Образование кислоты из:											
- арабинозы	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
- декстрина	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
- эскулина	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
- гуммиарабика	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
- инулина	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
- мальтозы	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
- салицина	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
- сахарозы	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
- ксилана	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
- ксилозы	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Потребность в рубцовой жидкости*	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Образование H_2	-	±	-	±	-	-	-	-	+	-	+

* - гемин заменяет потребность в рубцовой жидкости у большинства штаммов (143)

Пектин быстро ферментируется смешанными бактериями рубца, а также некоторыми простейшими. Среди чистых культур способность к ферментации пектина установлена у видов Lachnospira multiparis, B. succinogenes, B. ruminicola, B. fibrisolvens, Succinivibrio dex trinosolvens.

В опытах с бактериями, выделенными из рубца животных, получавших сено и траву, на 100 мкмолей пектина образовывалось 114 мкмолей уксусной и 38 мкмолей пропионовой кислоты. Бактерии от животных, получавших сено и концентраты, продуцировали в микромолях: 102 - уксусной, 36 - пропионовой, 4 - масляной и 1 - молочной кислоты. В каждом случае приблизительно 35% субстрата возвращалось в виде внутриклеточного полисахарида (89).

4.8.2.2. Lachnospira multiparis, Bryant and Small, 1956 (133)

Изогнутые 0,4 - 0,6 мкм шириной и 2 - 4 мкм длиной с тупозаостренными концами палочки. Подвижны, обладают латеральным до субтерминального монотрихоидным жгутиком. Слабо грампозитивны; анаэробы.

Клетки обычно располагаются единично или парами. Отдельные клетки имеют вид изогнутых или спиральных палочек. Иногда наблюдается образование небольшого числа очень длинных цепочек, клетки в которых изогнуты незначительно и имеют более закругленные концы. В жидких средах без рубцовой жидкости они могут быть упорядочены в очень длинные цепочки и нити. В молодой культуре многие клетки грамположительны, но быстро становятся грамнегативными.

Поверхностные колонии на агаре относительно большие, плоские, характерно волокнистые, белые. Колонии, растущие в глубине среды, имеют внешний вид клубков шерсти. Подобная морфология колоний обусловлена прорастанием через агар длинных нитей клеток. Встречается ли такое пронизывание растительного материала в рубце - не установлено, но известно, что большая часть колоний Lachnospira выделяется из плотной фракции содержимого рубца. Распространение этих бактерий в агаре может отражать способность к проникновению через срединную пектиновую пластинку растительных клеток.

Бактерии ферментируют глюкозу, фруктозу, целлобиозу, эскулин, пектин, салицин и сахарозу. Ферментация D-ксилозы вариабельна или слабая. L-арабиноза, целлюлоза, декстрин, галактоза, глицерол, гуммиарабик, инозитол, инулин, лактоза, мальтоза, маннитол, трегалоза и ксилан не сбраживаются. Крахмал не гидролизуется.

Главными продуктами ферментации глюкозы являются этанол, молочная, муравьиная, уксусная кислоты и CO_2. Образуется также небольшое количество водорода. Каталаза, индол, H_2S не образуются. Нитраты не редуцируются, желатина не разжижается. Реакция Фогес-Прокауэра обычно слабо позитивна, но может варьировать от отрицательной до сильно положительной.

Бактерии хорошо растут в средах без добавления CO_2 или бикарбоната и в среде, в которую вместо рубцовой жидкости введены дрожжевой экстракт и триптиказа. В глюкозном бульоне с рубцовой жидкостью образуется обильный флокулирующий осадок. Все штаммы хорошо растут в среде, содержащей витамины группы В, цистеин, глюкозу, аммоний в качестве источника азота, минеральные соли, ацетат, бикарбонат и CO_2 (141). Хороший рост наблюдается при 30 - 45^{0}С и отсутствует при 22 и 50^{0}С.

Выделены из преджелудков крупного рогатого скота и, вероятно, также встречаются в рубце других жвачных.

Типовой штамм: D32, ATCC 19207.

4.8.3. Бактерии рубца, гидролизующие крахмал и декстрины

Одной из важнейших функций микрофлоры рубца жвачных является гидролиз крахмала, которым особенно богаты зерновые корма. Крахмал легко сбраживается в преджелудках с образованием летучих и нелетучих жирных кислот и является доступным источником энергии как для животного, так и для многих видов микроорганизмов. Амилазами обладают некоторые целлюлозолитические бактерии рубца, например

Clostridium lochheadii, отдельные штаммы Bacteroides succinogenes и большинство штаммов Butyrivibrio fibrisolvens. Активно гидролизует крахмал Bacteroides ruminicola, а среди нецеллюлозолитических бактерий ведущая роль в ферментации крахмала принадлежит видам Streptococcus bovis, Bacteroides amylophilus, Succinimonas amylolytica, Selenomonas ruminantium.

4.8.3.1. Streptococcus bovis, Orla-Iensen, 1919 (167)

Сферические или овальные клетки 0,8 - 1,0 мкм в диаметре. Встречаются обычно парами, короткими цепочками, состоящими из 4 - 6 клеток, а иногда в длинных цепочках. Грамположительны.

На плотной питательной среде колонии можно обнаружить через 6-8 ч культивирования в виде чечевичек, растущих в глубине агара. Поверхностные колонии имеют вид гладких, блестящих пятен различной величины и формы, цвет которых варьирует от серо-белого до желтого и оранжевого.

Путем иммунизации кроликов Шатток (177) обнаружил у этого вида антиген группы Д. Разграничено, по крайней мере, 11 серотипов (165). Клетки окружают большие капсулы и типовая специфичность связана с капсулой. Типоспецифические антигены клеточной стенки также встречаются. Типовая специфичность у одного штамма была связана с N-ацетилглюкозамином (158). Реакции перекрестного типа наблюдаются с другими стрептококками групп Е и N (169).

Структура мукопептида подобна таковой других стрептококков, за исключением того, что кроссбредным соединением является треонин, и это может быть полезным таксономическим признаком (159).

Конечный pH в глюкозном бульоне варьирует в пределах 4,0 - 4,5. Кислота образуется из глюкозы, фруктозы, маннозы, лактозы, галактозы, мальтозы, сахарозы, раффинозы и салицина. Ферментация арабинозы, ксилозы, маннитола, сорбитола, трегалозы и инулина вариабельна. Не образуется кислоты из глицерина. Крахмал обычно гидролизуется и ферментируется с образованием кислоты. Это свойство может утрачиваться при пересевах (165). В бульоне с сахарозой образуются большие количества полисахарида (166). Когда культивируют на содержащих сахарозу агаровых средах при увеличенном давлении углекислого газа, большинство штаммов продуцирует обильные количества декстрана (145). На кровяном агаре большинство штаммов образует мелкие колонии с α-гемолизом различной интенсивности. Некоторые штаммы дают γ-гемолиз.

Среди стрептококков в питательных потребностях это наименее привередливый вид. Нивен и соавт. (166) не смогли показать потребности в какой-либо специфической аминокислоте. Волин и соавт. (185) обнаружили, что многие культуры могут использовать соли аммония в качестве источника азота. Необходимыми для роста и образования декстрана являются биотин или олеат (166, 126). Показано, что на интенсивность роста стрептококков и синтез ими амилазы существенное

влияние оказывает природа и концентрация углевода, а также соотношение крахмала и азота в питательной среде (21). Установлено также, что синтетические аминокислоты играют важную роль в регуляции жизнедеятельности амилолитических стрептококков. Метионин в концентрации 1 - 2 мг/мл среды стимулирует интенсивность роста культур Str. bovis и их амилазную активность, тогда как лизин в этих же дозах ингибирует ферментативную активность стрептококков (22). Источники: пищеварительный тракт коров, овец и других жвачных. Иногда этот микроорганизм встречается в больших количествах в испражнениях человека. Содержание Г+Ц в ДНК варьирует от 38 - 40 до 42 (Tm) моль%.

4.8.3.2. Bacteroides amylophilus, Hamlin a. Hungate, 1956 (152)

Это неподвижные, грамотрицательные, не образующие спор плеоморфные палочки (0,9 - 1,6×1,6 - 4,0 мкм), принимающие активное участие в гидролизе крахмала в рубце жвачных. Поверхностные колонии (2-дневные) при посеве методом «roll tube» на глюкозно-целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью имеют диаметр около 1 мм. Они бывают круглыми, целыми, слегка выпуклыми, просвечивающими, гладкими, блестящими от белого до ржаво-коричневого цвета. Колонии, растущие в глубине агара, имеют диаметр 0,8 мм и выглядят двояковыпуклыми, цельными или неправильными, белыми, мягкими и маслянистыми.

Эти бактерии не развиваются при отсутствии в среде CO_2. Рост начинается при наличии в газовой фазе не менее 4,5 - $9{,}0\times10^{-3}$М углекислоты и улучшается при повышении ее концентрации. Бикарбонат в концентрации 2×10^{-2}М заменяет CO_2. Формиат или смесь аланина, аспарагина, аргинина, лизина и глутаминовой кислоты не заменяют потребность в CO_2. В крахмальном бульоне культуры дают помутнение и имеют окончательный pH 5,5 - 5,7. Они не образуют каталазы, индола, сероводорода и не ферментируют глюкозу, арабинозу, ксилозу, галактозу, фруктозу, лактозу, сахарозу, целлобиозу, раффинозу, инулин, салицин, глицерол, маннитол, сорбитол, трегалозу, инозитол, эскулин и целлюлозу. Ассимилирует аммиак. Наиболее быстрый рост наблюдается при температуре 39 - 45^0С. Оптимум роста отмечен при pH 6,8 - 7,0.

Главными продуктами, образуемыми при гидролизе крахмала, являются: уксусная, муравьиная, янтарная и молочная кислоты, а также небольшие количества этанола. У одного из изученных штаммов соотношение продуктов метаболизма было следующим (ммоль): уксусная - 0,91, муравьиная - 0,76, янтарная - 0,69, молочная кислота - 0,13 и этанол - 0,025.

Встречается в рубце крупного рогатого скота спорадически, но когда присутствует, может быть преобладающим разрушителем крахмала и составлять до 10% от бактериальной популяции рубца (128, 140).

4.8.3.3. Succinimonas amylolytica, Bryant, Small, Bouma a. Chu, 1958 (135)

Прямые с закругленными концами размером 1 - 1,5×1,0 - 3,0 мкм грамнегативные палочки. Располагаются единично, парами и группами. Капсулы не обнаружены. Подвижны, имеют один полярный жгутик. Подвижность медленная, поступательная и быстро исчезает при контакте с воздухом. Строгие анаэробы. Споры и другие покоящиеся стадии неизвестны. Поверхностные колонии на глюкозно-целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью выглядят гладкими, цельными, выпуклыми, просвечивающими, светло-рыжевато-коричневыми и после 3-дневной инкубации достигают в диаметре 0,7 - 1,5 мм. Колонии, растущие в глубине среды, имеют форму двояковыпуклой линзы диаметром 0,7 - 1 мм. Рост в глюкозном бульоне с рубцовой жидкостью характеризуется легким, равномерным помутнением.

Энергетический метаболизм - ферментативный. Глюкоза сбраживается главным образом до янтарной и уксусной кислот, что сопровождается большим потреблением CO_2. Бутирата не образуется. Образование кислоты, но без газа, наблюдается из глюкозы, мальтозы, декстрина и крахмала. Арабиноза, ксилоза, фруктоза, целлобиоза, лактоза, сахароза, эскулин, салицин, целлюлоза, инулин, ксилан, глицерол, маннитол и лактат не сбраживаются. Аминокислоты или пептиды не ферментируются. H_2S, каталаза и индол не образуются, желатина не разжижается, реакция Фогес-Проскауэра - вариабельна. В глюкозной среде наблюдается хороший рост при замене рубцовой жидкости триптиказой и дрожжевым экстрактом, но требуется CO_2.

Типовой штамм хорошо растет в среде, содержащей глюкозу, CO_2-бикарбонатный буфер, минеральные соли, витамины группы В и ацетат. Аммиак служит источником азота и не может быть заменен аминокислотами или пептидами. Сульфид служит в качестве редуцирующего агента и источника серы. Ацетат (30 ммолей) является сильным стимулятором роста. Рост наблюдается при температуре 30 и 37^0С, но отсутствует при 22 и 45^0С. Конечный pH в недостаточно забуференной глюкозной среде равняется 5,2 - 5,8. Хороший рост обеспечивается при 6,5 - 7,0.

Эти бактерии обнаружены в рубцовом содержимом крупного рогатого скота, получавшего грубый корм и зерно, но обычно составляют менее 6% от общего количества жизнеспособных бактерий. Предположительно также встречаются в рубце других жвачных.

Типовой штамм: $B_2$4, ATCC 19206.

4.8.3.4. Selenomonas ruminantium (Certes), Wenyon, 1926 (181, 182) (Ancyromonas ruminantium Certes, 1889; Selenomastix ruminantium Woodcock and Lapage, 1913-1914; Spirillum ruminantium MacDonald e.a., 1959; Selenomonas lactilytica Hungate, 1966) (144, 186, 163, 89)

Это изогнутые или спиральные грамнегативные палочки с заокругленными или тупозаостренными концами, часто имеющие полулунную форму. Их размеры обычно варьируют в пределах 0,8 - 1×2- 7 мкм. Встречаются клетки единично, парами, а иногда короткими цепочками. Иногда в культурах присутствуют спиральные нити длиной вплоть до 20

мкм. Некоторые штаммы являются более мелкими - 0,4 - 0,6×1,8 - 3 мкм, тогда как другие достигают в ширину 3 мкм. В рубцовом содержимом размер клетки больше, нежели в чистой культуре (172). Капсулы не образуются, покоящиеся стадии неизвестны.

Поверхностные колонии на глюкозно-целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью выглядят целыми, незначительно выпуклыми, просвечивающими, светло-рыжевато-коричневого цвета и после 3-дневной инкубации достигают в диаметре 2 - 6 мм. Колонии, растущие в глубине среды, выглядят тонкими и чечевицеобразными. Рост в глюкозном бульоне с рубцовой жидкостью характеризуется обильным помутнением, часто с выпадением небольшого хлопьевидного осадка после 1 - 2 дней инкубации. Главными продуктами ферментации глюкозы являются пропионовая и уксусная кислоты, CO_2 и молочная кислота.

Кислота образуется из арабинозы, ксилозы, фруктозы, галактозы, глюкозы, целлобиозы, лактозы, мальтозы, эскулина, салицина, дульцитола и обычно из сахарозы и маннитола. Ферментация трегалозы, декстрина и инулина вариабельна. Не образуется кислоты из целлюлозы, гуммиарабика, пектина, ксилана и глицерола.

Крахмал гидролизуется некоторыми штаммами. Желатина не разжижается. Индол не образуется. Из цистеина обычно продуцируется H_2S. Нитраты редуцируют только некоторые штаммы.

Селеномонады растут в среде, содержащей витамины группы В, глюкозу, минеральные соли, CO_2, ацетат и некоторые другие летучие жирные кислоты (141). Такая жирная кислота как н-валериат необходима для хорошего роста некоторых штаммов даже в глюкозной среде, содержащей триптиказу и дрожжевой экстракт (160). Аммиак, цистеин, серин или аспарагиновая кислота могут служить в качестве единственного источника азота, а цистеин или сульфид в качестве источника серы. Рост наблюдается при 30 - 37^{0}С, иногда при 45^{0}С и отсутствует при температурах 22 и 50^{0}С. Конечный pH в недостаточно забуференной глюкозной среде 4,3 - 4,6. Содержание Г+Ц в ДНК 54,0 $\pm$ 0,8 моль%.

Обычно обильны в рубцовом содержимом любого жвачного животного, что легко определяется прямыми микроскопическими исследованиями. Выделены из рубца крупного рогатого скота, овец и лося.

Среди селеномонад разграничено 3 подвида: Selenomonas ruminantium subsp., ruminantium comb.nov., Selenomonas ruminantium subs. lactilytica (134) и Selenomonas ruminantium subsp. bryantii (171).

Первый подвид имеет такие же свойства, как и S. ruminantium. Описание отличительных особенностей второго подвида представлено в разделе "Бактерии рубца, использующие кислоты". Третий подвид обладает такими же свойствами, как и S. ruminantium subsp. ruminantium, за исключением того, что клетки в чистых культурах имеют большие размеры 2 - 3×5 - 10 мкм. H_2S из цистеина обычно не образуется, а арабиноза, ксилоза, галактоза, лактоза и дульцитол, как правило, не ферментируется.

В настоящее время установлено, что селеномонады составляют значительную часть микрофлоры рубца северных оленей (31, 32). Помимо типичных селеномонад в рубце оленей нередко наблюдаются особи с закрученными в клубки жгутиками. Число клубков на вогнутой поверхности клеток составляет один-два и реже больше. Кроме того, обнаружены селемомонады со своеобразными, не характерными для последних типами жгутикования, среди которых выделено два типа: полуперитрихиальный и перитрихиальный.

Первый характерен тем, что жгутики отходят только от выпуклой поверхности тела бактерии и отсутствуют на вогнутой. Клетки имеют типичную для селеномонад полулунную форму и размеры, при несколько большей ширине (3,1 - 4,4 мкм). Селеномонады с перитрихиальным типом жгутикования имеют размеры в пределах 2,9 - 4,0×4,3 - 7,7 мкм, а жгутики покрывают всю поверхность тела бактерии. У одной особи насчитывается до 110 и более жгутиков, а их длина не превышает 0,9 - 2,1 мкм.

Четкие, микроскопически легко дифференцируемые различия в типе жгутикования селеномонад позволили выделить две новые морфологические разновидности, названные Selenomonas ruminantium var. perithrixoides и Selenomonas ruminantium var. semiperithrixoides (32)

4.8.3.5. Succinivibrio dextrinosolvens, Bryant a. Small, 1956 (133)

Спиральные с заостренными концами 0,3 - 0,7×1- 7 мкм, грамнегативные палочки. Многие клетки являются короткими с одним или неполным завитком, но в культурах присутствуют и более длинные клетки, имеющие два или три завитка. Клетки располагаются единично, иногда в коротких цепочках. После культивирования на искусственных питательных средах некоторые штаммы становятся прямыми или слегка изогнутыми. Могут присутствовать разбухшие формы и круглые тельца. Клетки обладают быстрой вибрирующей подвижностью с помощью монотрихоидного полярного жгутика. Покоящиеся стадии неизвестны. Строгий анаэроб.

На глюкозно-целлобиозном агаре с рубцовой жидкостью поверхностные колонии имеют диаметр 1 - 2 мм и выглядят целыми, просвечивающими, светло-рыжевато-коричневыми. Колонии, растущие в глубине среды, имеют форму двояковыпуклой линзы. В глюкозном бульоне с рубцовой жидкостью наблюдается образование обильного флокулирующего осадка и равномерное помутнение.

Метаболизм - ферментативный. Из глюкозы образуются большие количества янтарной и уксусной кислот, а часто муравьиной и молочной кислот. Аминокислоты и пептиды не ферментируются. D -ксилоза, галактоза, глюкоза, мальтоза и декстрин сбраживаются с образованием кислоты. L -арабиноза, фруктоза, целлобиоза, сахароза, эскулин, салицин и маннитол ферментируются только некоторыми штаммами. Лактоза, трегалоза, целлюлоза, инулин, крахмал, ксилан, глицерол и инозитол

не сбраживаются. Крахмал не гидролизуют. Нитраты не редуцируют, желатину не разжижают. Каталазу, ацетоин, индол и H_2S не образуют.

Большинство штаммов хорошо растет в глюкозных средах, содержащих пептон и дрожжевой экстракт вместо рубцовой жидкости. Добавление CO_2-бикарбоната в среды улучшает рост. Хорошо растут при 30 - 37^{0}C и не дают роста при 22 и 45^{0}C. Конечный pH в слабо забуференной глюкозной среде равен 4,8 - 5,2.

Обнаружен в рубце крупного рогатого скота и овец (174, 184). Иногда он является наиболее многочисленной бактерией в рубце скота, получавшего рацион с высоким содержанием зерна (140). Предположительно эти бактерии присутствуют в рубце других жвачных. Типовой штамм: 24, ATCC 19716.

Из рубца жвачных выделены и другие бактерии, способные гидролизовать крахмал. Среди них идентифицированы Bacteroides vulgatus, Bacteroides uniformis, Clostridium butyricum и некоторые представители рода Fusobacterium. Однако эти бактерии обнаруживаются в преджелудках в сравнительно небольших количествах и, по-видимому, их роль в переваривании крахмала в этом органе невелика.

4.8.4. Бактерии рубца, использующие органические кислоты

В результате бактериальной ферментации в преджелудках жвачных накапливаются значительные количества летучих жирных кислот, которые используются организмом животного в качестве источников энергии и в биосинтетических процессах, а также являются стимуляторами роста многих видов бактерии рубца. При скармливании жвачным рационов с высоким содержанием зерна в их рубце могут накапливаться высокие количества лактата, который метаболизируется далее, например, селеномонадами. Многие бактерии рубца образуют муравьиную и янтарную кислоты, которые, однако, в преджелудках в значительных количествах не накапливаются, что свидетельствует о возможности их использования микроорганизмами в процессах обмена. Некоторые из этих бактерий, способных к использованию кислот в рубце - идентифицированы. Это Selenomonas ruminantium subsp. lactilytica, Veillonella alcalescens, Megasphaera elsdenii, Vibrio succinogenes.

4.8.4.1. Selenomonas ruminantium subsp. lactilytica, Bryant, 1956 (134), Selenomonas lactilytica, Hungate, 1966 (160)

Эта разновидность обладает такими же свойствами как и Selenomonas ruminantium, за исключением того, что она ферментирует молочную кислоту и глицерол. Возможны также антигенные различия. Молочная кислота ферментируется с образованием пропионовой, уксусной кислот и, вероятно, CO_2. Глицерол сбраживается, главным образом, до пропионовой кислоты с небольшими количествами молочной, янтарной и уксусной кислот (153). Хобсон и соавт. (154) обнаружили, что «О» антисыворотка от овечьего штамма S. ruminantium subsp. lactilytica реаги-

ровала со штаммом такого же подвида, полученного от крупного рогатого скота, но не со штаммом S. ruminantium. Это дает основание полагать, что два подвида могут отличаться по «0» антигенам.

Типовой штамм: ATCC 19205; PC 18

4.8.4.2. Veillonella alcalescens (Veillonella gazogenes, Micrococcus lactilyticus) (89)

Впервые эти бактерии были выделены из рубца овец в 1948 г. Джонсом. Это мелкие кокки, 0,3 - 0,5 мкм в диаметре. В световом микроскопе имеют внешний вид сферических диплококков, скоплений и коротких цепочек. Неподвижны, спор не образуют, грамнегативны.

Углеводы и полиолы не ферментируют. D-рибозу не сбраживают, но включают в нуклеиновые кислоты. Глюкокиназа, фруктокиназа и глюкозная пермеаза не обнаружены.

Из лактата культуры образуют ацетат, пропионат, CO_2 и H_2. Veillonella alcalescens обнаружена у скота, но в небольших количествах, и это вызывает сомнение, что она является метаболически важной в рубце крупного рогатого скота,

В лаборатории микробиологии ВНИИФБиП с.-х. животных Павловой (27) были выделены мелкие грамвариабельные кокки из рубца и слепой кишки овец. Они встречались при посеве разведений содержимого вплоть до 10^{-6}. На агаровых средах эти бактерии формировали мелкие до точечных, серо-белые колонии. В мазках кокки располагались одиночно, попарно и большими скоплениями. Изучение биохимических свойств у 7 штаммов показало, что все они ферментировали фруктозу, а один штамм, выделенный на среде с янтарной кислотой, сбраживал целлобиозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, глицерин и салицин. Три штамма ферментировали глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, а два из них дополнительно сбраживали целлобиозу, ксилозу, маннозу. За исключением одного штамма все были каталазоотрицательными и только два штамма редуцировали нитраты. Эти бактерии продуцировали из лактата одну пропионовую или пропионовую и уксусную кислоты и были идентифицированы как Veillonella gazogenes.

4.8.4.3. Megasphaera elsdenii Gutierrez et al, Rogosa, 1971, (173) (Организм LC Elsden and Lewis, 1953; рубцовый организм LC Elsden et al., 1956; Reptostreptococcus elsdenii Gutierrez e.a., 1959) (148, 149, 151)

Относительно большие неподвижные, не образующие спор кокки. Во влажных препаратах клетки сферические, диаметром в пределах 2,4 - 2,6 мкм. В окрашенных или фиксированных препаратах диаметр диплококков варьирует от 1,2 до 1,9 мкм. Иногда 8 - 10 диплококков соединены в цепочку. На тонких мазках клетки даже из 4-часовых культур являются грамнегативными.

Поверхностные колонии после 4-дневной инкубации имеют диаметр 0,5 - 0,2 мм, незначительно приподняты, круглые и целые. Их поверхность блестящая до незначительно шероховатой, от вязкой до маслянистой. Колонии, растущие в глубине среды, тонкие и дисковидные, до 4 мм в диаметре, зеленовато-желтые или цвета меда.

Бактерии хорошо растут в среде с 0,4% дрожжевого экстракта и содержащей 0,05% $КН_2PO_4$; 0,05% NH_4Cl; 0,03% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,03% тиогликолевой кислоты; 2% растворимого крахмала и 1,3% DL-лактата натрия при pH 7,4. Крахмал в среде и 5 или более процентов CO_2 облегчают выделение.

В среде, содержащей 0,4% дрожжевого экстракта, 0,3% тиогликолевой кислоты и 1% субстрата (pH 7,4) и в атмосфере 95% H_2 + 5% CO_2 при 35 - 38^{0}C наблюдается хороший рост и газообразование с лактатом, глюкозой и фруктозой. Рост и ферментация вариабельны в среде с глицеролом, мальтозой, маннитолом, сорбитолом и сахарозой, и отсутствуют при наличии в среде арабинозы, целлобиозы, декстрина, эскулина, галактозы, инулина, лактозы, маннозы, раффинозы, рамнозы, салицина, крахмала, трегалозы или ксилозы. Конечный pH при ферментации глюкозы или фруктозы 4,0 - 5,0; лактата - 7,8 - 8,0.

Из лактата образуются ацетат, пропионат, C_4- кислоты с прямой и разветвленной цепочкой, валериановая кислота, немного или отсутствует капроновая кислота, большое количество CO_2 и немного H_2. При ферментации глюкозы образуется немного муравьиной кислоты, меньше ацетата, пропионата, бутирата и валериата, а капроновая кислота (около 60% или более) является наиболее обильным продуктом. H_2S не образуется, желатина не разжижается. Нитраты не редуцируются, каталаза и индол не образуются.

Рост наблюдается в интервале температур от 25 до 40^{0}C, но обычно отсутствует при 45^{0}C. Некоторые штаммы растут при 45^{0}C, но не растут при 50^{0}C. Культуры, сохраняемые при 4^{0}C, должны пересеваться каждые две недели. В процессе лиофилизации могут погибать, но выживают в жидком азоте.

Обнаружены в рубце крупного рогатого скота, овец и слепой кишке свиней, получавших значительные количества крахмала. Штаммы из слепой кишки свиней отличались от рубцовых штаммов меньшими размерами клеток, ферментировали раффинозу и были вариабельными на ксилозе. Содержание Г+Ц в ДНК типового и двух подобных штаммов составляет 53,6 $\pm$ 0,5 моль%.

Типовой штамм: LCI, NCIB 8927; ATCC 25940

4.8.4.4. Vibrio succinogenes (89)

Эта бактерия представляет интересный пример организма, использующего промежуточные продукты ферментации. Водород или формиат окисляются с восстановлением малата или фумарата до сукцината, или нитрата до аммиака. Присутствующие в клетках цитохромы *в* и *с* предпо-

ложительно функционируют в фосфорилировании в период переноса электрона от восстанавливаемого субстрата к окисляемому.

Рост с фумаратом, малатом или нитратом наблюдается при полном отсутствии кислорода. С водородом организм может расти в присутствии кислорода, если последний содержится в очень низких концентрациях. Эта микроаэрофильность объясняется накоплением токсических концентраций перекиси водорода. При низкой концентрации кислорода пероксидаза препятствует накоплению перекиси, но концентрация энзима становится неадекватной для разложения перекиси, образующейся при высоких концентрациях кислорода.

Экология бактерии неясна. Она обнаруживается в количествах порядка 10^5/мл, но при наличии селективной среды могут обнаруживаться и большие количества. Размер, в котором водород переносится к фумарату до образования сукцината, может быть значительным, но сомнительно, что реакции V. succinogenes количественно важны в рубце. Возможно, лимитируют рост концентрации малата, фумарата или нитрата.

Если даже этот организм не имеет важного значения в рубце, он интересен как пример видов, способных существовать только в природных местах обитания, характеризующихся энергичной смешанной ферментацией, поскольку он требует непрерывного наличия, по крайней мере, двух промежуточных продуктов ферментации. Способность к восстановлению нитрата до аммиака, показанная на покоящихся клеточных суспензиях, является исключительной метаболической особенностью, поскольку не многие бактерии используют перенос электронов к аммиаку как часть реакции, обеспечивающей клетку энергией. Способностью восстанавливать нитрат до аммиака в ростовых целях обладают многие бактерии.

4.8.5. Метаногенные бактерии рубца жвачных

Выделение метаногенных бактерий представляет наибольшие трудности, по сравнению с другими видами (179). Они необычайно чувствительны к кислороду и рост начинается только при наличии в среде низкого окислительно-восстановительного потенциала (около 0,35 вольта при pH 7,0). Всего лишь 0,8 мкл кислорода в пробирке задерживают развитие колоний метаногенных бактерий, а 6 мкл полностью ингибируют их рост. Метанобактерии получают энергию для роста при образовании метана путем восстановления CO_2, используя электроны, производимые при окислении таких веществ, как водород и формиат, или путем ферментации ацетата и метанола с образованием в качестве продуктов метана и CO_2. Это высокоспециализированная физиологическая группа бактерий, которая не использует в качестве источников энергии углеводы, белки и другие органические вещества, кроме тех, которые указаны выше.

В преджелудках жвачных образование метана осуществляется, главным образом бактериями видов Methanobacterium ruminantium и Methanobacterium mobile, которые в руководстве Берги (127) помещены

в род Methanobacterium семейства Methanobacteriaceae. Род Methanobacterium, в котором типовым видом является грамнегативная, неподвижная, цилиндрическая палочка, теперь включает другие виды, которые, по-видимому, должны быть помещены в новые роды. Так, например, Methanobacterium mobile - подвижная бактерия с монотрихоидным типом жгутикования, а Methanobacterium ruminantium является строго грампозитивным видом, напоминающим по форме некоторые стрептококки. Из этого очевидно, что классификация метаногенных бактерий несовершенна и нуждается в уточнениях и улучшении.

4.8.5.l. Methanobacterium ruminantium, Smith a. Hungate, 1958 (179)

Это короткие, ланцетовидные до овальных палочки или кокки 0,7 мкм шириной и 0,8 - 1,8 мкм длиной. Встречаются преимущественно в парах, а также в цепочках, которые могут содержать до 20 или более клеток, напоминая стрептококки. Очень сильно грампозитивны, даже в относительно старых культурах. Неподвижны.

Поверхностные колонии в «roll tube» культурах с газовой фазой из H_2-CO_2 выглядят просвечивающими, выпуклыми, круглыми с цельными краями, обычно от белого до желтого цвета. Они обнаруживаются после 3-дневной инкубации при 37^0C и могут достигать в диаметре 3 - 4 мм в зависимости от количества колоний и имеющегося в наличии источника энергии. Колонии, растущие в глубине агара, имеют чечевицеобразную форму. Рост в жидкой среде с H_2 - CO_2 газовой фазой характеризуется равномерным помутнением или образованием хлопьевидного осадка. В последнем случае энергичное встряхивание приводит к разрушению осадка и даже суспензии.

Энергетически ростовой метаболизм включает восстановление CO_2 до метана водородом или формиатом, служащими в качестве доноров электронов. Использование формиата может быть медленным. Он также заменяет CO_2 как источник углерода при образовании метана, и, вероятно, формиат превращается до CO_2 через формиат-гидрогенлиазную систему. Углеводы, аминокислоты, метанол, этанол, ацетат, изобутират, пропионат, валериат, капроат,сукцинат и пируват в качестве доноров электронов не используются. Пируват не заменяет CO_2 как источник углерода при образовании метана, поскольку клетки непроницаемы для пирувата.

В дополнение к H_2 и CO_2 необходимыми в качестве источников энергии являются: ацетат, как главный источник клеточного углерода, аммоний, как главный источник азота, а сульфид может быть незаменимым и главным источником клеточной серы. Для роста требуется один или несколько витаминов группы В. Аминокислоты, пептиды и органические вещества дрожжевого экстракта эффективно не используются в качестве главных источников клеточного углерода, азота или серы. Для роста некоторых выделенных из рубца штаммов также требуется 2-метил-н-бутират, некоторые аминокислоты и еще неидентифицированные витаминоподобные ростовые факторы, присутствующие в рубцовой

жидкости и иле сточных вод и образуемые другими метаногенными бактериями (142).

Очень строгие анаэробы. Всего 0,8 мкл O_2 на 5 мл среды могут ингибировать рост. Температурный оптимум для роста около 37 - 43^{0}C. Слабый рост или его отсутствие наблюдается при 47^{0}C, а некоторые штаммы не растут при 33^{0}C. Рост не наблюдается при pH выше 8,0 и ниже 6,0.

Широко распространены в природе. Он считается главным метаногенным видом рубца жвачных, выделен из желудочно-кишечного тракта человека и является одним из наиболее многочисленных видов в анаэробных дигесторах сточных вод и в желудке обезьян.

4.8.5.2. Methanobacterium mobile, Paynter and Hungate, 1968 (168)

Прямые или слегка изогнутые 0,7 мкм шириной и 1,5 - 2,0 мкм длиной с закругленными концами палочки. Обычно встречаются единично или парами. Подвижны. Обладают одним полярным жгутиком. Грамнегативны. Колонии мелкие, просвечивающие, цельные, выпуклые, от бесцветных до палево-желтых. Они становятся видимыми после 4-дневной инкубации при 39^{0}C и достигают максимального диаметра 0,7 - 1,0 мм после 15-дневной инкубации. Колонии, растущие в глубине среды, имеют форму двояковыпуклой линзы диаметром 0,5 - 0,7 мм через 15 дней.

Энергетический метаболизм включает редукцию CO_2 до метана с помощью H_2 или формиата, служащих в качестве доноров электронов. Предположительно, формиат может заменять CO_2 как акцептор электронов. Соединениями, которые не используются в качестве доноров электронов, являются: ацетат, пропионат, бутират, изобутират, валериат, изовалериат, капроат, сукцинат, глюкоза, пируват, метанол, этанол, пропанол, изопропанол и бутанол.

Эта бактерия удовлетворительно не растет в средах, лишенных рубцовой жидкости или экстрактов смешанных рубцовых бактерий. Для нее необходимым является неидентифицированный фактор, подобный тому в котором нуждаются рубцовые штаммы Methanobacterium ruminantium (142).

Температурный максимум потребления газа растущими культурами составляет около 40^{0}C. Потребление было очень медленным при 30 и 45^{0}C и не наблюдалось в течение 28 дней при 28 или 50^{0}C. Максимальная скорость потребления газа в течение роста была при pH 6,1 - 6,9. Рост наблюдался при pH 5,9 и 7,7, но отсутствовал при pH 5,6.

Неоднократно выделены из рубцового содержимого одной коровы.

Метаногенез в преджелудках жвачных явление нежелательное, ибо около 8-10% валовой энергии корма теряется с метаном. Проблема состоит в том, чтобы определить факторы, препятствующие деятельности метаногенных бактерий.

Как указывалось выше, целлюлозолитические, ксилангидролизующие, пектинолитические, амилолитические и другие физиологические группы бак-

терий используют моно- и дисахариды, которые поступают в рубец с кормом и образуются в процессе гидролиза полисахаридов. Активно ферментируют простые углеводы многие виды рода Lactobacillus. Они являются важной составной частью рубцовой флоры телят, но могут присутствовать в больших количествах и в преджелудках взрослых животных, получающих высокозерновые рационы.

В рубце жвачных идентифицированы следующие виды лактобацилл: L. lactis, L. bifidus, L. brevis, L. acidophilus, L. buchneri, L. casei, L. fermentum, L. plantarum, L. cellobiosus. Поскольку молочнокислые бактерии изучаются продолжительное время, обширные данные о их свойствах имеются и в отечественной литературе (24, 25, 28, 29, 30, 33, 34), в связи с чем подробное описание лактобацилл в данном пособии не приводится.

4.9. ОСОБЕННОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА МОНОГАСТРИЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦЫ

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что обитающая в пищеварительном тракте моногастричных животных и птицы микрофлора играет важную роль в их питании.

Установлено, что основу микрофлоры пищеварительного тракта у свиней, лошадей, кроликов и птицы составляют не бактерии группы кишечной палочки и энтерококки, как считали в недавнем прошлом, а факультативно- и строго анаэробные микроорганизмы, среди которых преобладают бифидобактерии, лактобациллы, амилолитические и лактатферментирующие бактерии, бактероиды, стрептококки и другие организмы. Опыты Николичевой (35) показали, что в желудке, подвздошной и слепой кишках поросят 4,5-месячного возраста преобладают лактобациллы. Их количество возрастает с 9,96 - $13,3\times10^{9}$/г содержимого в желудке до 19,01 - $20,56\times10^{9}$/г химуса в слепой кишке и может составлять до 35-47% от общего числа бактерий. При этом, как правило, увеличивается численность лактатферментаторов. По данным Даусона с соавт. (189), в микрофлоре слепой и большой ободочной кишок лактобациллы составляли 28,5% от выделенных штаммов, бактероиды - 26,8%, стрептококки - 14,3%, не сбраживающие и сбраживающие углеводы палочки - 10,7 и 8,4% соответственно.

Желудок у свиней по своему строению представляет переходный тип между многокамерным желудком жвачных и однокамерным моногастричных. Свободная соляная кислота, выделяемая фундальными железами, в кардиальную зону желудка поступает лишь через 6 - 7 ч после кормления. Слюна и сок кардиальных желез обладает слабощелочной реакцией, что и позволяет функционировать микрофлоре (40).

Метаболическая активность микрофлоры в пищеварительном тракте свиней сравнима с таковой в рубце жвачных. Так, у подсвинков при нормированном кормлении в результате сбраживания микрофлорой клетчатки, крахмала и других компонентов корма в слепой кишке образуется от 14,5 до 18,2 мэкв/100 мл низкомолекулярных кислот, а молярные отношения уксусной, пропионовой, масляной и молочной кислот

находятся в зависимости от состава углеводной части рациона (41). За счет летучих жирных кислот, продуцирующихся в толстом отделе кишечника, у свиней обеспечивается от 9 до 23% необходимой на поддержание энергии (187).

Установлено, что у свиней, как и у жвачных животных, небелковый азот, и в частности мочевина, вовлекается в обмен через посредство кишечной микрофлоры. При даче ^{15}N мочевины обычным и гнотобиотическим поросятам, включение меченого азота в белки печени, почек, сердца, мышц и слизистой оболочки кишки наблюдалось только у первых и отсутствовало у вторых (10). Ощутимым является и синтез бактериального белка, который в толстом кишечнике при инфузии крахмала составляет около 5,2 г/100 г ферментированного полисахарида (191).

Аналогичная ситуация наблюдается и у птиц. Численность микрофлоры в зобе, и в особенности слепых отростках, у цыплят и кур довольно высока, а преобладающими среди микробных видов являются бифидобактерии, лактобациллы, неспороносные анаэробы, бактероиды и другие организмы (36, 45, 188). По данным Николичевой (36), микрофлора пищеварительного тракта кур-несушек весьма разнообразна по видовому составу, но преобладающими являются молочнокислые палочки видов: L. salivarius, L. acidophilus, L. fermentum, L. bifidus, L. lactis. Амилолитические микроорганизмы были представлены Bacteroides amylophilus, Bacteroides variabilis, Bacteroides fragilis, родом Peptostreptococcus; а лактатферментирующие: Propionibacterium raffinosaceum, Veillonella gazogenes, Propionibacterium acnes, Megasphaera elsdenii. У кур, получавших кормосмеси с содержанием протеина 14 - 19%, концентрация ЛЖК в зобе и тонком кишечнике варьирует в пределах 2,5 - 4,7 ммоля/100 г, а в слепых отростках 10,1 - 13,2 ммоля/100 г. Молярные соотношения ЛЖК изменяются незначительно: в зобе и тонком кишечнике 86,6 - 93,7% составляет уксусная кислота, 2,0 - 9,4% пропионовая, 1,0 - 3,5% масляная, 0,7 - 2,9% валериановая. В слепых отростках уровень ацетата уменьшается до 46,7 - 68,9%, а доля пропионата и бутирата увеличивается до 24,2 - 29,1% и 10,7 - 21,8% соответственно.

Анализируя состав микрофлоры у молодняка и взрослых особей разных видов животных и птицы Тимошко (45) пришла к выводу, что у цыплят в количественном отношении превалируют бифидобактерии; на втором месте - молочнокислые бактерии; на третьем - бактероиды; на четвертом - эубактерии; на пятом - энтеробактерии; на шестом - стрептококки, в т.ч. энтерококки, а у взрослых кур по численности указанные группы микроорганизмов распределяются в следующем порядке: бактероиды, эубактерии, пептококки, молочнокислые бактерии, бифидобактерии, стрептококки, энтеробактерии, стафилококки, бациллы и дрожжи.

У молодняка сельскохозяйственных животных (поросята, телята, жеребята) в количественном отношении превалируют бифидобактерии, также как и у цыплят, а у ягнят и взрослых особей свиней - бактероиды. Весьма важным представляется тот факт, что клостридии и стафило-

кокки выявлены лишь у животных с признаками гастроэнтерита или дисбактериоза.

Таким образом, представленные данные позволяют считать, что облигатная микрофлора кишечника молодняка моногастричных животных и птицы представлена преимущественно строгими и факультативными анаэробами.

Памятуя об этом, при изучении микрофлоры пищеварительного тракта свиней и птицы мы применили анаэробную технику Хангейта и питательные среды, используемые для культивирования бактерий рубца, с той лишь разницей, что в средах рубцовую жидкость заменяли экстрактами из содержимого желудочно-кишечного тракта или фекалий. Для приготовления экстрактов смешивали равные объемы кишечного химуса или птичьего помета и воды, твердые частицы осаждали центрифугированием при 14000 об/мин, надосадочную жидкость доводили до pH 7,0 - 7,2 и стерилизовали автоклавированием при 121^0C - 30 мин. (35, 188). Экстракты вводили в питательные среды в количестве 10% по объему. Среды готовили как описано выше (см.п.п. 4.2.4; 4.3.), а приготовление разведений и посев осуществляли анаэробным методом (см. п. 4.2.5.).

Как показали проведенные исследования, методы изучения анаэробной микрофлоры рубца жвачных оказались вполне адекватными и для исследования микрофлоры пищеварительного тракта свиней и птицы (36 - 39, 42 - 44), в силу чего нет необходимости детально их описывать в этом разделе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под. ред. Н.С.Егорова. М.: Изд-во Московского университета, 1983:133-135.
2. Тараканов Б.В. Методика приготовления электронномикроскопических препаратов микроорганизмов из содержимого рубца жвачных. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. жив., Боровск, 1968, 4(8): 56-59.
3. Тараканов Б.В. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий рубца жвачных. Новые методы и модификации биохим. и физиол. иссл. в животноводстве. Боровск, 1972: 92-95.
4. Березин И.В., Рабинович М.Л., Синицын А.П. Исследование возможностей кинетического спектрофотометрического метода определения глюкозы. Биохимия, 1977, 42, 9: 1631-1636.
5. Горева И.П. Модификация иммунохимического метода количественного определения целлюлозолитических руминококков. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. жив., Боровск, 1969, 5 (13): 61-65.
6. Грызлова 0.Н., Коленько Е.И. Получение чистых культур анаэробных целлюлозолитических микроорганизмов рубца. Материалы IV Всес. конф. по физиол. и биохим. основам повышения продуктивности с.-х. животных. Боровск, 1966, ч.1, с.224-226.
7. Грызлова 0.Н., Корнилов А.И. Выделение анаэробных целлюлозолитических культур из рубца жвачных. Доклады ВАСХНИЛ, 1968, 3: 35-38.
8. Долгов И.А.. Питательная среда для культивирования целлюлозолитических микроорганизмов. А.с. СССР, №981357, опубл. БИ, 1982, 46.
9. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наукова думка, 1982: 191.
10. Клесов А.А., Рабинович М.Л., Синицын А.П., Чурилова И.В., Григораш С.Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы. 1. Активность и компонентный состав целлюлазных комплексов из различных источников. Биоорганич. химия, 1980, 3, 8: 1225-1242.
11. Лищенко Т.В. Некоторые целлюлозолитические анаэробные микроорганизмы рубца овец. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. жив., 1967, 3: 58-61.
12. Синицын А.П. Черноглазов В.М., Гусаков А.В.. Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов. Итоги науки и техники, серия "Биотехнология", М., 1990, 25: 152.
13. Чюрлис Т.К. О методике определения активности расщепляющей целлюлозу микрофлоры преджелудков у крупного рогатого скота. В кн.: Кормление сельскохозяйственных животных, М.: Сельхозиздат, 1958: 470 - 475.
14. Долгов И.А. Выделение и идентификация амилолитических бактерий рубца жвачных. В кн.: Новые методы и модификации биохим. И физиолог. исслед. в животноводстве. Боровск, 1972, 2: 85.

15. Долгов И.А. Определение амилолитической активности рубцового содержимого. Там же: 87.
16. Мерина-Глускина В.М. Сравнительная оценка сахарифицирущего и декстринизирующего методов при определении активности амилазы крови у здоровых и больных острым панкреатитом. Лаб. дело, 1965, 3: 142.
17. Коленько Е.И., Шишов В.П., Гущин Н.Н., Долгов И.А.. Липолитические микроорганизмы преджелудков жвачных. В сб.: Доклады I Всес. симп. по липидному обмену с.-х. животных, 1974: 218-226.
18. Шишов В.П., Коленько Е.И., Долгов И.А. Липолитическая активность микроорганизмов рубца овец. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1974, 4(34): 71-73.
19. Методы общей бактериологии. Под ред.Ф.Герхардта и др. М.:Мир, 1984, 3: 264.
20. Розанов Н.И. Микробиологическая диагностика заболеваний сельскохозяйственных животных. М.: Сельхозгиз., 1952: 115-122.
21. Долгов И.А., Коленько Е.И. Амилазная активность Str. bovis. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, 1970, 9: 74-86.
22. Долгов И.А., Тараканов Б.В. Влияние синтетических аминокислот на жизнедеятельность амилолитических стрептококков вида Str. bovis. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1974, 4(34): 74-76.
23. Заварзин Г.А. Восьмое издание определителя бактерий Берги (критика). Микробиология, 1975, 44 2: 372-379.
24. Квасников Е.И., Нестеренко 0.А.. Некоторые вопросы систематики молочнокислых бактерий. Успехи микробиологии, 1966, 3: 3-24.
25. Квасников Е.И., Нестеренко 0.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975: 389.
26. Краткий определитель бактерий Берги (под ред. Дж.Хоулта). Перевод с англ., М.: Мир, 1980: 495.
27. Павлова Т.Е. Пропионовокислые бактерии рубца и слепой кишки овец. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, 1968, 2(6): 69-73.
28. Тараканов Б.В., Коленько Е.И. Характеристика палочковидных молочнокислых бактерий рубца жвачных животных, получавших в рационе синтетические азотсодержащие вещества. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1967, 5: 70-80.
29. Тараканов Б.В. Молочнокислая микрофлора рубца телят и влияние на нее кристаллического окситетрациклина. Ветеринария, 1965, 9: 22-24.
30. Тараканов Б.В. Цитоморфология некоторых молочнокислых бактерий, выделенных из рубца овец (электронномикроскопическое исследование). Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1969, 7: 165-176.
31. Тараканов Б.В. О микрофлоре рубца северных оленей. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1971, 3(22): 72-74.
32. Тараканов Б.В. Электронномикроскопическое изучение микрофлоры рубца северных оленей. Микробиология, 1972, 41, 5: 862-870.

33. Тараканов Б.В. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий рубца жвачных. Новые методы и модификации биохим. и физиолог. исследований в животноводстве. Боровск, 1972, 2: 92-95.
34. Тараканов Б.В., Курилов Н.В., Коршунов В.Н., Долгов И.А., Адамова 0.М. Аминокислотный состав протеина чистых культур молочнокислых бактерий, суммарных фракций микроорганизмов и простейших рубца жвачных. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1974, 3(33): 34-36.
35. Николичева Т.А. Влияние кормосмесей с БВК и гидролизными дрожжами на микрофлору пищеварительного тракта свиней. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, 1980, 23: 82-91.
36. Николичева Т.А. Роль микрофлоры в усвоении небелкового азота и процессах ферментации в пищеварительном тракте кур-несушек. Автореф. дисс... к.б.н., Боровск, 1975: 23.
37. Николичева Т.А., Тараканов Б.В., Долгов И.А., Шавырина Т.А., Кузнецов С.Г. Микрофлора пищеварительного тракта кур-несушек при разном уровне меди в рационе. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1978, 2(49): 65-68.
38. Николичева Т.А., Тараканов Б.В., Голенкевич Е.К., Комкова Е.Е. Изменение биоценоза пищеварительного тракта поросят при включении в рацион Bacillus mucilaginosus. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1989, 2(94): 31-35.
39. Николичева Т.А., Тараканов Б.В., Проваторов Г.В., Пименов Е.П, Соколовская Г.К. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка свиней при разных условиях кормления. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1990, 37: 165-173.
40. Слабицкий Я..И. Роль микрофлоры пищеварительного канала свиней в биосинтезе витаминов группы В (обзор). Сельхозбиология, 1982,17, 4: 513-517.
41. Сливицкий М.Г. Бродильные процессы и химический состав содержимого слепой кишки свиней при скармливании углеводов различных растений. Физиологический журнал СССР, 1976, 62, 11: 1684-1690.
42. Тараканов Б.В., Гущин Н.И.. Микрофлора зоба и тощей кишки цыплят, получавших с кормом ферментные препараты оризин и мелизим. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1969, 7: 177-187.
43. Тараканов Б.В., Долгов И.А., Гущин Н. Н., Шавырина Т.А. Микрофлора пищеварительного тракта цыплят при скармливании ферментных и антимикробных добавок. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1977,17: 128-133.
44. Тараканов Б.В., Пименов Е.П. Лактатферментирующие бактерии пищеварительного тракта свиней. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1990, 3(99): 53-56.
45. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных. Кишинев, "Штиинца", 1990: 189.

46. Ogimoto K., Imai S. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1980: 162-163.
47. Bryant M.P., Burkey L..A. Cultural methods and some characteristics of some of the numerous groups of bacteria in the bovine rumen. J. Dairy Sci., 1953, 36, 3: 205-217.
48. Bryant M.P., Robinson J.M. An improved non-selective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. J. Dairy Sci., 1961, 44, 8: 1446-1456.
49. Bryant M.P. Symposium on microbial digestion in ruminants: Identification of groups of anaerobic bacteria active in the rumen. J. Anim. Sci., 1963, 22: 801-813.
50. Caldwell D.R., Bryant M.P. Medium without rumen fluid for non-selective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microbiol., 1966, 14, 5: 794-801.
51. Cleland W.W. Dithiothreitol. A new protective reagent for SH - groups. Biochemistry, 1964, 3: 480
52. Doetsch R.N., Robinson R.Q., Shaw J.W. Techniques employed in cultural investigations if the bacteriology of bovine rumen contents. J. Anim. Sci. 1952, ll, 3: 536-544.
53. Hobson P.M., Mann S.O. Special techniques for handling anaerobic bacteria. J. Gen. Microbiol.,1970, 60: 5.
54. Hungate R.E. The anaerobic mesophillic cellulolytic bacteria. Bact. Rev., 1950, 14: l.
55. Hungate R.E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology. Academic Press Inc. New York, 1969, 3b: 117-132.
56. Smith P.H., Hungate R.E. Isolation and characterization of Methanobacterium ruminantium sp. nov. J. Bacteriology, 1958, 75, 6: 713-718.
57. De Mann J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bact., 1960, 23: 130-135.
58. Edwards T., McBride B.C. New method for the isolation and identification of metanogenic bacteria. Appl. Microbiol., 1975, 29: 540-545.
59. Giesecke D., Wiesmayr S., Ledinek M. Peptostreptococcus elsdenii from the caecum of pigs. J. Gen. Microbiol., 1970, 64: 123-126.
60. Henderson C. A study of the lipase production by Anaerovibrio lipolytica, a rumen bacterium. J. Gen. Microbiol., 1971, 65: 81-89.
61. Henderson C. An improved method for enumerating and isolating lipolytic rumen bacteria. J. Appl. Bact., 1973, 36: 187-188.
62. Hobson P.N., Mann S.O., Oxford A.E. Some studies on the occurence and properties of a larde gram-negative coccus from the rumen. J. Gen. Microbiol., 1958, 19: 462-472.
63. Holdeman L.. V., Cato E.P., Moore W.E.C. Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., Virginia Polytech. Inst. and State Univ., Blackburg, Virginia, 1977: 1-156.
64. Huisingh J., McNeil J.J., Matrone G. Sulfate reduction by a Desulfovibrio species isolated from sheep rumen. Appl. Microbiol., 1974, 28: 489-497.

65. Hungate R.E. Microorganisms in the rumen cattle fed a constant ration. Can. J. Microbiol., 1957, 3: 289-311.
66. Latham M.J., Wolin M.J. Use of a serum bottle technique to study interactions between strict anaerobes in mixed culture. Techniques for the study of mixed populations. Lovelock D.W. a.Davies R., editors, Acad. Press, New York, 1978: 113-124.
67. Mac Pherson M.J. Isolation and identification of amylolitic Streptococci from the rumen of sheep. J. Path. Bact., 1953, 66: 95-102.
68. Mitsuoka T., Sega T., Yamamoto S. Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. Zbl. Bakt., I, Abt. Orig., 1965, 195: 455-469.
69. Mitsuoka T. Cultivation of Bifidobacterium. Bifidobacterium. Mitsuoka T. a. Homma M., editors, Japan Scientific Socienties Press, Tokyo, 1978: 45-53.
70. Ogimoto K. Veillonella alcalescens in the rumen. Thesis, University of Tokyo, Tokyo, 1970: 1-190.
71. Paynter M.J.B., Hungate R.E. Characterization of Methanobacterium mobilis sp. n., isolated from the bovine rumen. J. Bact., 1968, 95: 1943-1951.
72. Pringsheim E.G. Lampropedia nyalina Schroeter 1886 and Vannielia aggregata n.g., n. sp., with remarks on natural and on organized colonies in bacteria. J. Gen. Microbiol., 1955, 13: 285-291.
73. Rogosa M., Mitchell J.A., Wiseman R.F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral Lactobacillus. J. Dent. Res., 1951, 30: 5.
74. Scardovi V., Trovatelli L.D., Caroclani F., Sgorbati B. Bifid bacteria in bobine rumen. Arch. Mikrobiol., 1969, 68: 278-294.
75. Tiwari A.D., Bryant M.P., Wolfe R.S. Simple method for isolation of Selenomonas ruminantium and some nutritional characteristics of the species. J. Dairy Sci., 1969, 52: 2054-2056.
76. Vera N.D., Dumoff M. Culture media. Manual Clinical Microbiology, 2nd ed., Lennete E.H., Spaulding E.H., Truant J.P., editors, Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C., 1974.
77. Werner H. Megasphaera elsdenii - Ein normaler Bewohner des menschlichen Dickdarm?Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt. Orig., 1973, A 223: 343-347.
78. Wolin M.J., Wolin E.A., Jacobs N. J. Cytochrome-producting anaerobic vibrio, Vibrio succinogenes sp. n. J. Bacteriol., 1961, 81: 911-917.
79. Yoshinari T. N_2O reduction by Vibrio succinogenes. Appl. Envirom. Microbiol., 1980, 39: 81-84.
80. Akin D.E. Association of rumen fungi with various forage grasses - Anim. Feed Sci. Technol., 1987, 16: 273-285
81. Bauchop T. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. - Appl. Environ. Microbiol., 1979, 38: 148-158.
82. Bauchop T., Mountford D.O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogenes - Appl. Environ. Microbiol., 1981,42: 1103-1110.
83. Bryant M.P., Robinson J.M. An improved non-selective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. J. Dairy Sci., 1961, 44, 8: 1446-1456.

84. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 1956, 28, 3: 350-356.
85. Gall L.S., Smith S.E., Becker D., Stark C.N., Loosli J.K. Rumen bacteria in cobalt deficient sheep. J. Anim. Sci., 1950, 7, 4: 526.
86. Ghose T.K., Montenecourt B.S., Eveleigh D.E. Measure of cellulase activity (substrates, assays, activities and recommendations). Preprint of IUPAC Commission on biotechnology, 1981.
87. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities. Pure and Appl. Chem., 1987, 5, 2: 257-268.
88. Hungate R.E. The anaerobic mesophillic cellulolytic bacteria. Bact. Rev., 1950, 14: 1-50.
89. Hungate R.E. The rumen and its microbes. Acad. Press, New-York, London, 1966.
90. Joblin K.N. Isolation, enumeration and maitenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Appl. Environ. Microbiol., 1981, 42: 1119-1122.
91. Kudo R.R. Protozoology, 4th edn., C.C.Thomas-publisher, Springfield, Illinois, USA, 1954.
92. Lowe S.E., Theodorow M.K., Trinci A.P.J. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semidefined media lacking rumen fluid. J. Gen. Microbiol., 1985, 131: 2225-2229.
93. Orpin C.G. Studies on the rumen flagellate Neocallimastix frontalis. J. Gen. Microbiol., 1975, 91: 249-262.
94. Orpin C.G. Studies of the rumen flagellate Sphaeromonas communis. J. Gen. Microbiol., 1976, 94: 270-280.
95. Orpin C.G. The rumen flagellate Piromonas communis: Its life-history and invasion of plant material in the rumen. J. Gen. Microbiol., 1977, 99: 107-117.
96. Rajevary Ravindranath M.N., Ravindranath M.N. A simple procedure to detect chitin in delicate structures. Acta Histochemica, 1975, 53: 203-205.
97. Scott H.W., Dehority B.A. Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria. J. Bacteriol., 1965, 89, 5: 1169-1175.
98. Somogyi M.J. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 1952, 195, 1: 19-23.
99. Stallcup O.T. The release of ammonia nitrogen from urea, ammoniated molasses and soybean oil meal in the presence of rumen microorganisms. J. Dairy Sci., 1954, 37, 12: 1449-1460.
100. Wenyon C.M. Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists. Bailliere, Tindal and Cox, London, 1926.
101. Yarlett N.C., Yarlett N., Orpin C.G. Lloyd D. Cryopreservation of the anaerobic rumen fungus Neocallimastix patriciarum. Lett. Appl. Microbiol., 1986, 3: 1-3.
102. Giesecke D., Lawlor M., Walser-Karat Karin. Comparative studies on the digestive physiology of sheep fed on semipurified or roughage-

concentrate diets. 1. Microbiological investigations. J. Brit. Nutr., 1966, 20: 383-392.
103. Hamlin L., Hungate R. Culture and physiology of starch digesting bacterium (Bacteroides amylophilus n. sp.) from the bovine rumen. J. Bact., 1956, 72: 548-554.
104. Hobson P., Mann S. J. Gen. Microbiol., 1961, 25, 2: 227.
105. Blain J.A., Caskie M. - Chem. Ind., 1975, 1: 17
106. Botsford J.L., DeMoss R.D. J. Bacteriol., 1971, 105: 303-312.
107. Burger H. Zentralbl. Bacteriol., Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig., 1967, 202: 97-109.
108. Christensen W.B. J. Bacteriol., 1946, 58: 461-466.
109. Christensen W.B. Res. Bull. N1, Weld Country Health Department, Greeley, Colo, 1949.
110. Cowan S.T. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 2nd ed., Cambridge University Press, London, 1974.
111. Evans J.B., Niven C.F. - J. Bacteriol., 1950, v.59, p.545-550.
112. Holdeman L.V., Cato E.P., Moore W.E.C. (ed). Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blackburg, 1977.
113. Hwang M., Ederer G.M. J. Clin. Microbiol., 1975, 1, 114-115.
114. Neyra C.A., Dobereiner J., Lalande R., Knowles R. Can. J. Microbiol., 1977, 23: 300-305.
115. Niven C.F., Ir., Smiley K.L., Sherman J.M. J. Bacteriol., 1942, 43: 651-660.
116. Sierra G. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol., 1957, 23: 15-22.
117. Simmons J.S. J. Infect. Dis., 1926, 39: 201-214.
118. Skerman V.B.D. A guide to the identification of the genera of bacteria. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1967.
119. Smith R.F., Rogers R.R., Bettge C.L. - Appl. Microbiol., 1972, 23: 423-424.
120. Wheater D.M. J. Gen. Microbiol., 1955, 12: 123-132.
121. Whittenbury R. J. Gen Microbiol. 1964, 35: 13-26.
122. Allison M.J., Bryant M.P., Doetsch R.N. Studies on the metabolic finction of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. 1. Incorporation of isovalerate into leicine. J. Bacteriol., 1962, 33, 3: 523-532.
123. Allison M.J., Bryant M.P., Katz I., Keeney M. Metabolic finction of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. 2. Biosynthesis of higher branched-chain fatty acids and aldehydes. J. Bacteriol.,1962, 83, 5: 1084-1093.
124. Ayers W.A. Nutrition and physiology of Ruminococcus flavefaciens. J. Bacteriol., 1958, 76, 5: 504-509.
125. Ayers W.A. Phosphorylation of cellobiobe and glucose by Ruminococcus flavefaciens. J. Bacteriol., 1958, 76, 5: 515-517.
126. Barnes I.J., Seeley H.W., Van Demark P.J. Nutrition of Streptococcus bovis in relation to dextran formation. J. Bacteriol., 1961, 82, 1: 85-93.
127. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eighth Edition. R.E. Buchanan a. N.E.Gibbons Co-editors. Baltimore, 1974: 1246.

128. Blackburn T.H., Hobson P.N. Further studies on the isolation of proteolytic bacteria from the sheep rumen. J. Gen. Microbiol., 1962, 29, 1: 69-81.
129. Brown D.W., Moore W.E.C. Distribution of Butyrlvibrio fibrisolvens in nature. J. Dairy Sci.,1960, 43: 1570-1574.
130. Bryant M.P. The isolation and characteristics of a spirochete from the bovine rumen. J. Bacteriol., 1952, 64, 3: 325-335.
131. Bryant M.P., Doetsch R.N. A study of actively cellulolytic rod-shaped bacteria of the bovine rumen. J. Dairy Sci., 1954, 37: 1176-1183.
132. Bryant M.P., Small N. Characteriatics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle. J. Bacteriol., 1956, 72, 1: 22-26.
133. Bryant M.P., Small N. Characteriatics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle. J. Bacteriol., 1956, 72, 1: 22-26.
134. Bryant M.P. The characteristics of strains of Selenomonas isolated from bovine rumen contents. J. Bacteriol., 1956, 72, 2: 162-167.
135. Bryant M.P. et al. Bacteroides ruminicola n. sp. and Succinimonas amylolytica the new genus and species. Species of succinic acid-producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. J. Bacteriol., 1958, 76, 1, 15-23.
136. Bryant M.P., Small N., Bouma C., Robinson I.M. Characteristics of ruminal anaerobic cellulolytic cocci and Cillobacterium cellulosolvens n.sp. J. Bacteriol., 1958, 76, 5: 529-537.
137. Bryant M.P., Robinson l.M., Chu H. Observations on the nutrition of Bacteroides succinogenes - a ruminal cellulolytic bacterium. J. Dairy Sci., 1959, 42: 1831-1847.
138. Bryant M.P., Robinson l.M. Some nutritional requirements of genus the Rumminococcus. Appl. Miorobiol., 1961, 9, 91-95.
139. Bryant M.P., Robinson l.M. Studies on the nitrogen requirements of some ruminal cellulolytic cocci. Appl. Microbiol., 1961, 9: 96-103.
140. Bryant M.P., Robinson l.M., Lindahl I.L. A note on the flora and fauna in the rumen of steers fed a feedlot bloat-provoking ration and the effect of penicillin. Appl. Microbiol., 1961, 9: 511-515.
141. Bryant M.P., Robinson l.M. Some nutrition characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. J. Bacteriol., 1962, 84, 4: 605-614.
142. Bryant M.P., Tzeng S.F., Robinson l.M. Joyner A.E. Jr. Nutrient requirements of methanogenic bacteria. In: Pohland F.G., Anaerobic Biological Treatment Processeses. Advances in Chemistry, Series 105, American. Chem. Soc., Washington, D.C., 1971: 23-40.
143. Caldwell D.R., White D.C., Bryant M.P., Doetcsch R.N. Specificity of the heme requirement for growth of Bacteroides ruminicola. J. Bacteriol., 1965, 90, 6: 1645-1654.
144. Certes A. Note sur les microorganismes de la panse des ruminants. Bull. Soc. Zool., Fr., 1889, 14: 70-73.

145. Dain J.A.., Neal A.K., Seeley H.W. The effect of carbon dioxide on polysaccharide production by Streptococcus bovis. J. Bacteriol., 1956, 72, 2: 209-213.
146. Dehority B.A. Characterization of several bovine rumen bacteria isolated with xylan medium. J. Bacteriol., 1966, 91, 5: 1724-1729.
147. Dehority B.A., Scott H.W., Kowaluk Patricia. Volatile fatty acid requirements of cellulolytic rumen bacteria. J. Bacteriol., 1967, 94, 3: 537-543.
148. Elsden S.R., Levis D. The production of fatty acids by a gramr-negative coccus. Biochem. J., 1953, 55: 183-189.
149. Elsden S.R., Volcani B.E., Gilchrist F.M.C., Lewis D. Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. J. Bacteriol., 1956, 72, 5: 681-689.
150. Gill J.W., King K.W. Nutritional characteristics of a Butyrivibrio. J. Bacteriol., 1958, 75: 666-673.
151. Gutierrez J., Davis R.E., Lindahl I.L., Warwick E.J. Bacterial changes in the rumen during the onset of feed-lot bloat of cattle characteristics of Peptostreptococcus elsdenii n. sp. Appl .Microbiol., 1959, 7, 1: 16-22.
152. Hamlin L.J., Hungate R.E. Culture and physiology of a starch digesting bacterium (Bacteroides amylophilus n.sp.) from the bovine rumen. J. Baoteriol., 1956, 72, 4: 548-554.
153. Hobson P.N., Mann S.O. The isolation of glycerol-fermentig and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. J. Gen. Miorobiol., 1961, 25, 2: 227-240.
154. Hobson P.N., Mann S.O., Smith W. Serological tests of a relationship between rumen Selenomonads in vitro and in vivo. J. Gen. Microbiol., 1962, 29, 2: 265-270.
155. Hungate R.E. Studies on cellulose fermentation. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium. J. Bacteriol., 1944, 48: 449-513.
156. Hungate R.E. Polysaccharide storade and growth efficiency in Ruminococcus albus. J. Bacteriol., 1963, 86, 4: 848-854.
157. Jarvis B.D.W. Antigenic relations of cellulolytic cocci in the sheep rumen. J. Gen. Microbiol.,1967, 47, 2: 309-319.
158. Kane J.A., Karakawa W.W. Immunochemical analysis of Str. bovis, strains 19, cell walls. J. Gen. Microbiol., 1969, 56, 2: 157-164.
159. Kane J.A., Lackland H., Karakawa W.W., Krause R.M. Chemical studies on the structure of mucopeptide isolated from Str. bovis. J. Bacteriol., 1969, 99, 1: 175-179.
160. Kanegasaki S., Takahashi H. Finction of growth factors for rumen microorganisms. l. Nutritional characteristics of Selenomonas ruminantium. J. Bacteriol., 1967, 93, 1: 456-463.
161. Kistner A., Gouws L. Cellulolytic cocci occurring in the rumen of sheep conditioned to lucerne hay. J. Gen. Microbiol., 1964, 34, 3: 447-458
162. Lee H.C., Moore W.E.C. Isolation and fermentation characteriatics of strains of Butyrivibrio from ruminal ingesta. J. Bacteriol. 1959, 77: 741-747.

163. Mac Donald J.B., Madlener E.M., Socransky S.S. Observations on Spirillum sputigenum and its relationship to Selenomonas species with special reference to flagellation. J. Bacteriol., 1959, 77, 5: 559-565.
164. Margherita S.S., Hungate R.E. Serological analysis of Butyrivibrio from the bovine rumen. J. Bacteriol., 1963, 86: 855-860.
165. Medrek T.F., Barnes E.M. The physiological and serological properties of Streptococcus bovis and related organisms isolated from cattle and sheep. J. Appl. Microbiol., 1962, 25: 169-179.
166. Niven C.F., Washburn M.R., White J.C. Nutrition of Streptococcus bovis. J. Bacteriol., 1948, 55, 5: 601 - 606.
167. Orla-Jensen S. The lactic acid bacteria. Hst, Copenhagen, 1919, p.l-196.
168. Paynter M.J.B., Hungate R.E. Characterization of Methanobacterium mobilis sp.n. isolated from the bovine rumen. J. Bacteriol., 1968, 95, 5: 1943-1951.
169. Perry K.D., Newland L.G.M., Briggs C.A.E. Group D rumen streptococci with type antigens of group N. J. Pathol. Bacteriol., 1958, 76: 589-590.
170. Pittman K.A., Bryant M.P. Peptides and other nitrogen sources for growth of Bacteroides ruminicola. J. Bacteriol., 1964, 89, 2: 401-410.
171. Prins R.A. Isolation and fermentation characteristics of Selenomonas ruminantium var. bryanti var.n. from the rumen of sheep. J. Bacteriol., 1971, 105, 3: 820-825.
172. Purdom M.P. Micromanipulation in the examination of rumen bacteria. - Nature (London), 1963, 198: 307-308.
173. Rogosa M. Transfer of Peptostreptococcus elsdenii Gutierrez et al, to a new genus Megasphaera [M. Elsdenii (Gutierrez et al.) comb. nov.]. Int. J. Syst. Bacteriol., 1971, 21, 2: 187-189.
174. Scardovi V. Studies in rumen microbiology 1. A succinic acid producing vibrio: main physiological characters and enzymology of its succinic acid forming system. Ann. Microbiol. Enzimol., 1963. 13: 171-187.
175. Shane B.S., Couws L., Kistner A. Cellulolytic bacteria occuring in the rumen of sheep conditioned to low-protein teff hay. J. Gen. Microbiol., 1969, 55: 445-457.
176. Sharma M.P. Immunochemical studies of cellulases from several strains of Ruminocoocus flavefaciens. Ph.D.Thesis, North Carolina State University Raleigh, 1968: 1-112.
177. Shattock P.M.F. The streptococci of group D; the serological grouping of Streptococcus bovis and observation on serologically refractory group D strains. J. Gen. Microbiol., 1949, 3: 80-92.
178. Sijpesteijn A.K. Cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. Thesis University of Leiden, the Netherlands, 1948.
179. Smith P.H., Hungate R.E. Isolation and characterization of Methanobacterium ruminantium n. sp. J. Bacteriol., 1958, 75, 6: 713-718.
180. Van Gylswyk N.O., Hoffman J.P.L. Characteristics of cellulolytic cillobacteria from the rumens of sheep fed teff (Eragrostis tef) hay diets. J. Gen. Microbiol., 1970, 60: 381-386.

181. Wenyon C.M. Protozoology. v.1, Bailliere, Tindall and Cox., London, 1926: 778.
182. Wenyon C.M. Spirochaetes. - In.: Wenyon, Protozoology, v.2, William Wood and Co., New York, 1926: 1233-1288.
183. Wegner G.H., Foster E.M. Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by Bacteroides succinogenes. J. Bacteriol., 1963, 85: 53-61.
184. Wilson S.N. Some carbohydrate-fermenting organisms isolated from the rumen of the sheep. J. Gen. Microbiol., 1953, 9: 1-11.
185. Wolin M.J., Manning G.B., Nelson W.O. Ammonium salts as a sole source of nitrogen for the growth of Streptococcus bovis. J. Bacteriol., 1959, 78, 1: 147- 149.
186. Woodcock H.M., Lapage G. Ona remarkable type of protisten parasite. - Quart. J. Microscop. Sci., 1914, 59: 431-457.
187. Argensio R.A. Volatile fatty acid production and absorption the large intestine of the pig. Les collogues de Vinra, 1982, 12: 207-215.
188. Barnes E.M., Impey C.S. The isolation and properties of the predominant anaerobic bacteria in the caeca of chickens and turkeys. Brit. Poultry Sci., 1970, 11, 4: 467-481.
189. Dawson K.A. et al. Appl. Environm. Microbiol., 1984, 47, 1: 210-212.
190. Dequchi et al. J. Nutrition, 1978, 108, 10: 1572-1579.
191. Gargallo J., Zimmerman D. J. Nutrition, 1981, 111, 8: 1390-1396.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ

1. ТЕХНИКА ВЗЯТИЯ ПРОБ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА У ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ТРАНСПОРТИРОВКА В ЛАБОРАТОРИЮ **5**
ЛИТЕРАТУРА **7**
2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ IN VITRO ПРИ ИЗУЧЕНИИ СМЕШАННЫХ АССОЦИАЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА ЖВАЧНЫХ **8**
2.1. СИСТЕМА НЕПРЕРЫВНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ **9**
2.2. ЗАМКНУТАЯ СИСТЕМА ФЕРМЕНТАЦИИ **10**
2.3. ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ IN VITRO. **10**
2.3.1. Буферные растворы и питательные среды **10**
2.3.2. Подготовка материала для исследований **13**
2.3.3. Сосуды для ферментации и отбор проб **15**
2.3.4. Создание анаэробиоза и перемешивание инкубационной среды **16**
2.3.5. Температура и продолжительность инкубации **17**
2.3.6. Регулирование pH и прекращение ферментации **17**
ЛИТЕРАТУРА **18**
3. ПРОСТЕЙШИЕ РУБЦА И МЕТОДЫ ИХ ИЗУЧЕНИЯ **22**
3.1. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТЕЙШИХ **22**
3.1.1. Голотрихи рубца **23**
3.1.2. Энтодиниоморфы рубца **24**
3.1.2.1. Род Entodinium **24**
3.1.2.2. Род Diplodinium **24**
3.1.2.3. Род Epidinium **25**
3.2. МЕТОДЫ ФИКСАЦИИ И ОКРАШИВАНИЯ ПРОСТЕЙШИХ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ **26**
3.2.1. Фиксация формалином **26**
3.2.2. Формалинизированный солевой раствор метилового зеленого **26**
3.2.3. Формалинизированный солевой раствор трипанового синего **27**
3.2.4. Железо-гематоксилиновое окрашивание по Гейденгайну (Heidenhein's) **27**
3.2.5. Импрегнация инфузорий серебром **28**
3.2.6. Витальные методы окрашивания **29**
3.3. ПОДСЧЕТ ПРОСТЕЙШИХ **30**
3.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИЙ ИНФУЗОРИЙ ИЗ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА. **31**
3.5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОСТЕЙШИХ **32**
3.5.1. Метод культивирования смешанной популяции простейших по Имаи с соавт. **33**
3.5.2. Культивирование отдельных видов энтодиниоморфных инфузорий по Колеману **33**
3.5.3. Культивирование Dasytricha по Кларку и Хангейту **34**
3.5.4. Культивирование других видов простейших **38**
ЛИТЕРАТУРА **38**

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ ПРЕДЖЕЛУДКОВ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ 40
4.1. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 40
4.1.1 Прямой микроскопический подсчет общего количества микроорганизмов 40
4.1.2. Приготовление электронномикроскопических препаратов микроорганизмов из содержимого рубца жвачных 42
4.2. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ РАБОТЫ СО СТРОГО АНАЭРОБНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ РУБЦА ЖВАЧНЫХ 44
4.2.1. Газовые смеси и их очистка 44
4.2.2. Редуцирующие агенты 46
4.2.3. Контроль окислительно-восстановительного потенциала 46
4.2.4. Приготовление питательных сред и растворов 47
4.2.5. Приготовление разведений и посев методом ролл-тьюб (roll tube culture). 50
4.3. РЕЦЕПТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ БАКТЕРИЙ РУБЦА 51
4.3.1. Среды для лактобацилл 51
4.3.2. Среды для бифидобактерий 52
4.3.3. Среды для стрептококков 52
4.3.4. Среды для целлюлозолитических бактерий 53
4.3.5. Среды для метаногенных бактерий 53
4.3.6. Среды для Vibrio succinogenes 53
4.3.7. Среды для сульфатредуцирующих бактерий 54
4.3.8. Среды для Megasphaera 54
4.3.9. Среда для Selenomonas 54
4.3.10. Среда для Anaerovibrio 55
4.3.11. Среда для липолитических бактерий 55
4.3.12. Среда для Veillonella 55
4.3.13. Среда для Lampropedia 55
4.3.14. Среда для субкультивирования 55
4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА ЖВАЧНЫХ 56
4.4.1. Метод in vitro 56
4.4.2. Метод in vivo 58
4.4.3. Определение численности целлюлозолитических бактерий в содержимом рубца 59
4.4.4. Методы определения активности целлюлаз 59
4.4.4.1. Определение целлюлозолитической активности смешанной микрофлоры преджелудков по методу Хендерсона, Хорвата и Блока в модификации Чюрлиса 61
4.4.4.2. Определение целлюлазной активности по фильтровальной бумаге 63
4.4.4.3. Определение активности целлюлазного комплекса по аморфной целлюлозе или авицелу (авицелазная активность) 64
4.4.4.4. Определение карбоксиметилцеллюлазной (КМЦ-азной) активности 65

4.4.4.5. Определение экзоглюкозидазной активности целлюлазного комплекса ... 66
4.4.5. Методы определения восстанавливающих сахаров ... 67
4.4.5.1. Определение сахаров по методу Сомоджи-Нельсона ... 67
4.4.5.2. Динитросалициловый метод определения сахаров ... 68
4.4.5.3. Феррицианидный метод определения сахаров ... 69
4.4.5.4. Фенолсернокислый метод определения сахаров ... 69
4.4.6. Исследование анаэробных целлюлозолитических грибов пищеварительного тракта жвачных ... 70
4.4.6.1. Определение концентрации зооспор в содержимом рубца ... 70
4.4.6.2. Исследование колонизации субстратов анаэробными грибами in situ ... 70
4.4.6.3. Первичное выделение анаэробных целлюлозолитических грибов 71
4.4.6.4. Поддержание чистых культур анаэробных целлюлозолитических грибов в коллекции ... 73
4.5. ИЗУЧЕНИЕ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ПРЕДЖЕЛУДКОВ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ... 74
4.5.1. Выделение и культивирование крахмалгидролизующих бактерий ... 74
4.5.2. Определение амилазной активности крахмалгидролизующих микроорганизмов фотометрическим методом ... 77
4.6. ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ РУБЦА ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ ... 78
4.7. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ У ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ РУБЦА ... 80
4.7.1. Образование кислот и газов из углеводов ... 82
4.7.2. Гидролиз эскулина ... 83
4.7.3. Гидролиз крахмала ... 83
4.7.4. Гидролиз гиппурата ... 84
4.7.5. Гидролиз желатины ... 84
4. 7.6. Гидролиз казеина ... 85
4.7.7. Образование аммиака из аргинина ... 85
4.7.8. Образование сероводорода ... 86
4.7.9. Образование индола ... 87
4.7.10. Воздействие на лакмусовое молоко ... 88
4.7.11. Редукция нитратов и денитрификация ... 89
4.7.12. Исследование гемолитических свойств ... 91
4.7.13. Потребление цитрата ... 92
4.7.14. Потребность в формиате и фумарате ... 93
4.7.15. Определение образования каталазы ... 93
4.7.16. Определение коагулазы ... 94
4.7.17. Определение оксидазы ... 94
4.7.18. Определение липазы ... 95
4.7.19. Определение уреазы ... 96
4.7.20. Определение фосфатаз ... 98
4.7.21. Определение ацетилметилкарбинола ... 99
4.7.22. Толерантность к желчи ... 99

4.8. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ РУБЦА ЖВАЧНЫХ 100
4.8.1. Целлюлозолитические микроорганизмы рубца жвачных 100
4.8.1.1. Род Ruminococcus 101
4.8.1.1.1. Ruminococcus flavefaciens 102
4.8.1.1.2. Ruminococcus albus 103
4.8.1.2. Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes 103
4.8.1.3. Род Butyrivibrio 105
4.8.1.3.1. Butyrivibrio fibrisolvens 106
4.8.1.4.Cillobacterium cellulosolvens, Eubacterium cellulosolvens 107
4.8.1.5. Спорообразующие целлюлозолитические палочки 108
4.8.1.5.1. Clostridium cellobioparum 108
4.8.1.5.2. Clostridium lochheadii 108
4.8.1.5.3. Clostridium longisporum 110
4.8.2. Бактерии рубца, гидролизующие гемицеллюлозу и пектин 110
4.8.2.1. Bacteroides ruminicola 111
4.8.2.2. Lachnospira multiparis 112
4.8.3. Бактерии рубца, гидролизующие крахмал и декстрины 113
4.8.3.1. Streptococcus bovis 114
4.8.3.2. Bacteroides amylophilus 115
4.8.3.3. Succinimonas amylolytica 115
4.8.3.4. Selenomonas ruminantium 116
4.8.3.5. Succinivibrio dextrinosolvens 118
4.8.4. Бактерии рубца, использующие органические кислоты 119
4.8.4.1. Selenomonas ruminantium subsp. lactilytica 119
4.8.4.2. Veillonella alcalescens 120
4.8.4.3. Megasphaera elsdenii 120
4.8.4.4. Vibrio succinogenes 121
4.8.5. Метаногенные бактерии рубца жвачных 122
4.8.5.l. Methanobacterium ruminantium 123
4.8.5.2. Methanobacterium mobile 124
4.9. ОСОБЕННОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА МОНОГАСТРИЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦЫ 125
ЛИТЕРАТУРА 128