

БИЯШЕВ К.Б., КИРКИМБАЕВА Ж.С., БИЯШЕВ Б.К., ЕРМАГАМБЕТОВА С.Е.,
ЖОЛДАСБЕКОВА А.

Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан

УСТОЙЧИВОСТЬ АТТЕНУИРОВАННОГО ШТАММА *E. COLI* 64Г К ЖЕЛЧИ И СОЛЯНОЙ КИСЛОТЕ

Аннотация

Изучена устойчивость аттенуированного штамма *E.coli* 64Г к желчи и соляной кислоте. Установлено, что накопление биомассы исследуемого штамма зависело от концентрации желчи в среде. При высеве суспензии исследуемых культур в разведении - 10^2 на МПА, выросших в МПБ с содержанием различных концентраций желчи и соляной кислоты через 24 и 48 часов наблюдался рост тестируемого штамма со сред, содержащих до 20% желчи и до 1,5% соляной кислоты.

В средах с содержанием 30 и 40% желчи и 1,8%, 2,0% и 2,5 % соляной кислоты роста штамма *E.coli* 64Г не наблюдалось.

Ключевые слова: штамм *e.coli* 64г, желчь, соляная кислота

Для ветеринарной практики в качестве средств, предназначенных для коррекции кишечного биоценоза, стимуляции откорма, повышения естественной резистентности молодняка предложено достаточное количество отечественных и импортных пробиотических препаратов различного видового состава. Эти препараты не имеют противопоказаний к применению и в комплексе с ветеринарно-санитарными мероприятиями могут положительно влиять на организм животного. Иммунобиологические препараты на основе живых бактерий, антагонистически активны в отношении возбудителей инфекционных болезней и не оказывают отрицательного влияния на представителей кишечной микрофлоры. При их использовании стимулируется иммунный ответ организма животных, возобновляется нормобиоценоз, при этом продукты животноводства остаются экологически чистыми. При подборе полезных микроорганизмов следует учитывать много условий и подбирать штаммы необходимо из большого количества бактерий, которые обладают высокой скоростью роста и быстро приживляются в среде желудочно-кишечного тракта [1,2].

Механизм действия пробиотиков проявляется в их способности активно заселять желудочно-кишечный тракт, производить биологически активные метаболиты, которые обеспечивают их выживаемость в борьбе с патогенными микроорганизмами, устойчивости к действию желудочного сока и желчи [3]. Поэтому поиск микроорганизмов, которые можно использовать в качестве пробиотиков, представляет собой основу для разработки пробиотического препарата и проведения настоящих исследований.

В задачу исследований входило определение устойчивости аттенуированного штамма *E.coli* 64Г к желчи и соляной кислоте.

Методы проведения исследований

Объектом исследования явился штамм *E.coli* 64Г, полученный в результате проведенной селекционной работы с целью использования его в перспективе для изготовления пробиотического препарата.

Определение устойчивости к желчи. Штамм *E.coli* культивировали на МПБ (рН 7.0-7.4), содержащей 1,5, 10, 20, 30 и 40% желчи. В экспериментах использовали препарат

желчи медицинский (*Chole medicata*), содержащий натуральную пузырную желчь крупного рогатого скота.

Исследуемую культуру *E.coli* культивировали в течение 24 и 48 часов. Устойчивость к желчи определяли по уровню накопления биомассы, изменению числа КОЕ и pH среды. Количество жизнеспособных клеток бактерий в 1 мл суспензии (число колониобразующих единиц – КОЕ) определяли методом предельных разведений (от 10^2 до 10^9) при высеве на плотные питательные среды (МПА).

Учет результатов проводили после внесения суспензии культур разных разведений на МПА и культивирования их в термостате при 37°C в течение 18-20 часов путем подсчета выросших колоний.

Определение устойчивости к соляной кислоте. Определение чувствительности штамма *E.coli* к соляной кислоте проводили фотокалориметрическим методом по изменению оптической плотности бульонных культур при добавлении различных концентраций соляной кислоты, которая сравнивалась с контролем, где наблюдался рост исследуемой культуры в средах без наличия соляной кислоты. В качестве эталонной культуры использовали штамм *E.coli 04*.

Штамм *E.coli* культивировали на МПБ (pH 7.0-7.4), содержащей 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,5%, 1,8%, 2,0% и 2,5 % соляной кислоты. Инкубировали в течение 24 и 48 часов. Результаты роста исследуемой культуры в питательных средах (МПБ) с содержанием и без содержания соляной кислоты проводили через 24 и 48 часов культивирования сред в термостате при 37°C .

Результаты исследования и обсуждение.

Результаты исследования показали, что накопление биомассы исследуемого штамма зависело от концентрации желчи в среде. При высеве суспензии исследуемых культур в разведении - 10^2 на МПА (определение живых клеток), выросших в МПБ с содержанием различных концентраций желчи через 24 и 48 часов наблюдался рост штамма *E.coli 64Г* со сред, содержащих 1%, 5%, 10% и 20% желчи.

Наибольшая биомасса накапливалась на 1 сутки (через 24 часа) культивирования, концентрация бактерий штамм *E.coli 64* (КОЕ) при высеве с разведения 10^2 КОЕ равнялся 91 КОЕ из 100.

Титр бактерий при высеве исследуемой культуры через 48 часов равнялся в среднем 64-72 КОЕ из 100.

Рост штамма *E.coli64Г* на средах, содержащей 30 и 40% желчи не наблюдался.

Определение чувствительности бактерицинпродуцирующих штаммов эшерихий к соляной кислоте

Определение чувствительности штамма *E.coli 64Г* к соляной кислоте проводили фотокалориметрическим методом по изменению оптической плотности бульонных культур при добавлении различных концентраций соляной кислоты, которая сравнивалась с контролем, где наблюдалось размножение исследуемых культур в средах без наличия соляной кислоты. В качестве эталонной культуры использовали штамм *E.coli 04* (S – форма).

Одновременно, устойчивость к соляной кислоте исследуемых культур эшерихий определяли по уровню накопления биомассы, изменению числа КОЕ и pH среды. Количество жизнеспособных клеток бактерий в 1 см³ суспензии (число колониобразующих единиц – КОЕ) определяли методом предельных разведений (от 10^2 до 10^9) при высеве на плотные питательные среды (МПА).

Каждый штамм исследуемых культур выращивали на МПБ (pH 7.0-7.4), содержащей 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,5%, 1,8%, 2,0% и 2,5 % соляной кислоты. Штаммы культивировали в течение 24 и 48 часов. Результаты роста исследуемых культур в

питательных средах (МПБ) с содержанием и без содержания соляной кислоты проводили через 24 и 48 часов культивирования сред в термостате при 37⁰С.

Изучения резистентности штаммов эшерихий к соляной кислоте фотокolorиметрическим методом показали, что при учете через 24 часа наблюдался рост исследуемой культуры *E.coli* 64Г в средах с содержанием соляной кислоты в концентрациях 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, и при исследовании выросших штаммов через 48 часов отмечен рост в средах, содержащих соляную кислоту в концентрациях 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%. В контроле (на средах, не содержащих соляную кислоту) наблюдался рост всех культур.

Параллельно изучали устойчивость исследуемой культуры эшерихий к соляной кислоте по уровню накопления биомассы методом предельных разведений (от 10² до 10⁹) при высеве выросших культур (через 24 и 48 часов) на плотные питательные среды (МПА).

Результатов опыта учитывали проведением подсчета выросших колоний после посева суспензии исследуемой культуры разных разведений на МПА и культивирования их в термостате при 37⁰С в течение 24 часов.

Исследования показали, что при высеве 24-часовой суспензии исследуемой культуры в разведении - 10² на МПА (определение живых клеток), выросших в МПБ с содержанием соляной кислоты в концентрациях 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,5%, 1,8%, 2,0% и 2,5 % рост наблюдался со сред, содержащих 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,5% соляной кислоты. Аналогичные результаты были получены при высеве 48-часовой суспензии исследуемой культуры в тех же концентрациях. количество выросших колоний штамма *E.coli* 64Г составил в среднем от 55 до 64 колоний.

Высевы со сред содержащих 1,8%, 2,0% и 2,5 % соляной кислоты не дали роста исследуемой культуры, независимо от экспозиции культивирования.

Таким образом, аттенуированный штамм *E.coli* 64Г обладает определенной устойчивостью к желчи и соляной кислоте, что позволяет нам проводить дальнейшие исследования с целью использования данного штамма в качестве пробионта.

Литература:

1 Олейник А.В. Расстройства желудочно-кишечного тракта у телят раннего возраста. [Текст]: / А.В. Олейник // Ветеринария.-2009.-№ 1.-С. 6-8.

2 Малик Н.И., Панин А.Н. Ветеринарные пробиотические препараты. [Текст]: /Н.И.Малик// Ветеринария.-2000.-№ 6.-С. 46-50.

3 Машенцева Н.Г., Хорольский В.В. Функциональные стартовые культуры в мясной промышленности. Де Ли принт, Москва, 2008, 310 с.

Түйін

**БИЯШЕВ К.Б., КИРКИМБАЕВА Ж.С., БИЯШЕВ Б.К., ЕРМАГАМБЕТОВА С.Е.,
ЖОЛДАСБЕКОВА А.**

Қазақ ұлттық аграрлық университет, Алматы қ., Қазақстан

АТТЕНУИРЛЕНГЕН *E.COLI* 64Г ШТАМЫНЫҢ ӨТКЕ ЖӘНЕ ТҰЗ ҚЫШҚЫЛЫНЫ ТӨЗІМДІЛІГІ

Аттенуирленген *E.coli* 64Г штаммының төзімділігі зерттелген.

Зерттелген штамның биомасса жинауы өт және тұз қышқылының концентрациясына байланысты екені анықталды. Әр түрлі концентрацияда өт және тұз қышқылы қосылған ЕПС

өсірілген *E.coli* 64Г өсіндінің 10^2 дәрежесінде сұйылтылған суспензиясын ЕПА себінді жасалып, 24-48 сағаттан кейін 20 пайызға өт және 1,5 пайызға дейін тұз қышқылы қосылған орталарда зерттелген штамның өсуі анықталды.

30%, 40% өт және 1,8%, 2,0%, 2,5 % тұз қышқылы қосылған орталарда *E.coli* 64Г штамның өсуі байқалмады.

BIYASHEV K.B., KIRKIMBAEVA J.C., BIYASHEV B.K., ERMAGAMBETOVA S.E., ZHOLDASBEKOVA A.

RSE "Kazakh National Agrarian University" KS MES RK, Almaty, Kazakhstan

STABILITY OF ATTENUATED STRAINS *E.COLI* 64Г TO BILE ACID AND HYDROCHLORIC ACID

Summary

Stability of the attenuated strain of *E.coli* 64Г to bile and hydrochloric acid. Found that biomass accumulation test strain was dependent on the concentration of bile in the medium. At sowing the test suspension cultures at a dilution 10^2 on MPA at grown in MPB containing various concentrations of bile after 24 and 48 hours was observed with growth of the strain *E.coli*64Г containing 20% of bile and 1.5% hydrochloric acid.

In media containing 30 and 40% bile and 1.8%, 2.0% and 2.5% hydrochloric acid *E.coli* 64Г growth was not observed.

Key words: strains *e.coli* 64Г, bile acid, hydrochloric acid

Practice veterinary medicine as a means intended for the correction of intestinal biocenosis, stimulate feeding, increase the natural resistance of calves offered a sufficient number of domestic and imported products of different probiotic species composition. These drugs do not have contraindications to the use and in combination with the animal health interventions can have a positive influence on the body of the animal. Immunobiological preparations based on live bacteria antagonistic activity against infectious diseases and is not detrimental to the representatives of the intestinal microflora. Using them stimulate the immune response of animals, normobiocenosis resumed while livestock products are environmentally friendly. The selection of useful microorganisms should consider many conditions and strains to select from a large number of bacteria, which possess a high growth rate and quickly engraftment in the gastrointestinal tract [1, 2].

The mechanism of action of probiotics is manifested in their ability to actively colonize the gastrointestinal tract, to produce biologically active metabolites, which ensure their survival in combating pathogenic microorganisms resistant to gastric juice and bile [3]. Therefore the search for microorganisms which can be used as probiotics, is the basis for the development of probiotic and these studies.

The task of the research was to determine the stability of an attenuated strain of *E. coli* 64Г to bile and hydrochloric acid.

Research methods

The object of the study was the strain *E. coli* 64Г obtained as a result of selection in order to use it in future for producing probiotic.

Determination of resistance to bile. *E.coli* strain was cultured on MPB (pH 7.0-7.4) containing 1.5, 10, 20, 30, and 40% of bile. In the experiments, the bile Medical (Chole medicata), containing the natural bile of cattle.

E.coli culture studied for 24 and 48 hours. Resistance to bile was determined by the level of biomass accumulation, changes in the number of CFU and the pH of the medium. The number of

viable bacterial cells in 1 ml of the suspension (number of colony forming units - CFU) were determined by the method of limit dilutions (from 10^2 to 10^9) in seeding on solid nutrient medium (MPA).

Analysis of results was carried out after making suspension cultures at different dilutions and MPA culturing them in an oven at 37^0 C for 18-20 hours by counting grown colonies.

Determination of resistance to hydrochloric acid. Determination of the sensitivity of the strain E.coli to hydrochloric acid was performed by photocalorimeter method in changing the optical density of broth cultures by the addition of various concentrations of hydrochloric acid, which was compared with the control, which an increase in the study of culture in media without the presence of hydrochloric acid. As reference culture strain of E.coli 04 was used.

Strain E.coli was cultured on MPB (pH 7.0-7.4) containing 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.5%, 1.8%, 2.0% and 2.5% of hydrochloric acid and incubated for 24 and 48 hours. The results of the study of growth in culture medium (MPB) with and without contents of hydrochloric acid was conducted at 24 and 48 hours of culture media in an incubator at 37^0 C.

Results and discussion.

The results showed that the accumulation of biomass test strain was dependent on the concentration of bile in the medium. At seeding the test suspension cultures at a dilution of - 10^2 MPA to (determination of living cells) grown in the MPB containing various concentrations of bile after 24 and 48 hours was observed growth E.coli 64 Γ with media containing 1%, 5%, 10% and 20% of bile.

The greatest biomass accumulated to 1 day (24 hours) culture, the concentration of bacteria E.coli 64 (CFU) during sowing with dilution 10^2 CFU amounted to 91 CFU from 100.

The titer of bacteria when sowing in 48 hours amounted to an average 64-72 of 100 CFU.

E.coli 64 Γ growth on media containing 30 and 40% of bile was not observed.

Determination of the sensitivity of strains of Escherichia, producing bacteriocin, to hydrochloric acid

Determination of the sensitivity of the strain E.coli 64G to hydrochloric acid was performed by photocalorimeter method for changing the optical density of broth cultures by the addition of various concentrations of hydrochloric acid, which was compared with the control, where there was duplication study of cultures in media without the presence of hydrochloric acid. As reference culture strain of E.coli 04 (S - form) was used.

Simultaneously, the resistance to hydrochloric acid of Escherichia determined accumulation level of biomass change in the number of CFU and pH. The number of viable bacterial cells per 1 cm³ suspension (number of colony forming units - CFU) was determined by limiting dilution (from 10^2 to 10^9) when sowing on solid nutrient medium (MPA).

Each strain was grown in MPB (pH 7.0-7.4) containing 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.5%, 1.8%, 2.0% and 2.5% hydrochloric acid. The strains were cultured for 24 and 48 hours. Results of the growth in the test culture medium (MPB) with and without contents of hydrochloric acid was conducted at 24 and 48 hours of culture media in an incubator at 37^0 C.

Studies of resistant of Escherichia to hydrochloric acid by photocalorimeter method showed that when the observed after 24 hours growth E.coli 64 Γ culture in media containing hydrochloric acid in concentrations of 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.2%, and the study of strains grown within 48 hours marked growth in media containing hydrochloric acid in concentrations of 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8% . In the control (in media containing no hydrochloric acid) was observed growth of crops.

Parallel study investigated the stability of Escherichia to hydrochloric acid accumulation level of biomass by limiting dilution (from 10^2 to 10^9) when sowing crops grown (at 24 and 48 hours) on solid nutrient medium (MPA).

Conduction of the experimental results taken into account counting of colonies after plating a suspension culture under study at different dilutions of MPA and culturing them in the oven at 37⁰ C for 24 hours.

Studies have shown that when sowing 24-hour culture in the suspension investigated dilution - 10² in MPA (determination of living cells) grown in the MPB containing hydrochloric acid in concentrations of 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.5%, 1.8%, 2.0% and 2.5% increase was observed with media containing 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.5% hydrochloric acid. Similar results were obtained when sowing 48-hour study the suspension culture at the same concentrations. Number of colonies E.coli 64Г averaged between 55 and 64 colonies.

Seeding with media containing 1.8%, 2.0% and 2.5% hydrochloric acid gave no growth culture under study, regardless of the exposure of cultivation.

References:

1 Oleynik A.V. Disorders of the gastrointestinal tract of calves early age. [Text]/A. Oleynik//Veterinariya.-2009. - № 1.- P.6-8.

2 Malik N.I., Panin A.N. Veterinary probiotic preparations. [Text] / N.I. Malik // Veterinary.-2000. - №6.- P.46-50.

3 Mashentseva N.G., Khorolsky V.V. Functional starter cultures in the meat industry. De Lee print, Moscow, 2008.- 310 p.