

ПРАВИЛА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОРМОВ

РАЗРАБОТАНЫ Всесоюзным научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии и специалистами Главного управления ветеринарии МСХ СССР.

УТВЕРЖДЕНЫ Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 10 июня 1975 г.

1. ОТБОР ПРОБ И СОСТАВЛЕНИЕ СРЕДНЕГО ОБРАЗЦА

1.1. Настоящие правила регламентируют единые методы бактериологического исследования кормов животного и растительного происхождения, комбикормов и рыбной муки.

1.2. Отбор проб для бактериологического исследования при наличии затаренной продукции проводят согласно следующей таблицы.

Объем партии в упаковочных единицах	Отбор проб
До 10 От 10 до 100 От 101 и выше	От каждой упаковочной единицы От 10 упаковочных единиц От 10 упаковочных единиц и дополнительно по 3 из каждых 100 упаковочных единиц

Примечание. 1 мешок = 1 упаковочной единице.

1.3. При наличии незатаренной продукции пробы берут не менее чем из 20 мест однородной партии со всей площади насыпи. Пробы можно отбирать в том же количестве с периодическими интервалами при погрузке и выгрузке из транспортных средств и бункеров.

1.4. Однородной партией считается количество корма, которое изготавливается по единой технологии в одну смену, затаренное в мешки или в незатаренном виде (насыпью) и доставленное одним видом транспорта.

1.5. Отбор проб проводят сухим, стерильным пробным щупом. После взятия проб от каждой партии пробный щуп очищают и дезинфицируют. Вес первичной пробы должен быть не менее 100 г.

1.6. Для бактериологического исследования от каждой партии корма составляют два средних образца весом не менее 500 г. Один из них направляют в лабораторию, а другой сохраняют на предприятии (хозяйстве) до окончания исследования.

1.7. Для упаковки средних образцов применяют стерильную пластмассовую или стеклянную тару.

1.8. Об отборе проб составляют акты в двух экземплярах. Акты должны содержать следующие данные: название предприятия (хозяйства), вид продукции, объем (вес) партии, вид упаковки (тары), дату изготовления, дату отбора проб.

2. МЕТОДЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Определение общего количества микробных клеток

2.1.1. В стерильную пробирку помещают 1 г корма, взятого из среднего образца (взятие корма для навески одноразовое), добавляют 9 мл физиологического раствора и тщательно встряхивают (получают разведение 1 : 10). Из полученной взвеси готовят последующие разведения (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000, 1 : 1000000). После оседания взвешенных частиц из верхнего слоя жидкости делают посева.

Для количественного учета микробного обсеменения в стерильные бактериологические чашки вносят по 1

мл каждого разведения и заливают 10-15 мл стерильного, расплавленного и охлажденного до температуры 44-45 °С мясо-пептонного агара. Осторожно покачивая чашки, засеянный материал равномерно распределяют в агаре. После застывания среды чашки помещают (вверх дном) в термостат при температуре 37 °С.

После 24-48-часового термостатирования проводят подсчет выросших колоний только в чашках, где содержатся не более 300 колоний. Результаты, полученные при подсчете колоний, умножают на разведения, суммируют и определяют количество микробов в 1 г корма.

Например, в одной чашке оказалось 200 колоний, в другой - 21 и третьей - 1. В эти чашки посев проводили из пробирок с разведениями соответственно 1 : 10 000, 1 : 100 000, 1 : 1 000 000. Следовательно, 1 г корма содержит

$$\frac{200 \times 10000 + 21 \times 100000 + 1 \times 1000000}{3} =$$

= 1,7 млн. микробных клеток.

2.2. Исследования на сальмонеллы

2.2.1. Метод последовательного обогащения. Навеску исследуемого материала 50-200 г (50 г от 10 и менее, 100 г от 10 до 100 и 200 г от 101 и выше упаковочных единиц) измельчают в стерильной фарфоровой ступке и помещают в колбу, содержащую среду предварительного обогащения (пептонная вода, МПБ с содержанием 5% маннита) при соотношении материала и среды 1:5.

Содержимое колбы тщательно перемешивают и помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 16-18 ч производят посевы на бактериологические чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами: висмут-сульфит агар, средой Плоскирева или Левина (по две чашки) и на две (по выбору) основные среды обогащения (селенитовый бульон, магниевую среду, среды Киллиана, Мюллера, Кауфмана) в соотношении 1 : 5. Лучшими являются селенитовый бульон и магниевая среда.

После 16-18 ч выдерживания в термостате при 37 °С из обогатительных сред бактериологической петлей производят вторично посевы на чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами, которые помещают в термостат при 37 °С.

Засеянные чашки просматривают через 16-24-48 ч.

На висмут-сульфит агаре *S.typhi* и *S. paratyphi* А растут в виде мелких, нежных, серовато-зеленых колоний с черным центром; *S. choleraesuis* - в виде зеленых колоний. Колонии почти всех других сальмонелл значительно крупнее, темно-коричневого цвета с металлическим блеском, окруженные светлым ореолом, цвет участка среды под колонией черный.

На среде Плоскирева сальмонеллы растут в виде прозрачных или нежно-розовых колоний, на среде Левина - прозрачные, бледные, нежно-розовые или розовато-фиолетовые колонии.

В случае обнаружения колоний, подозрительных на сальмонеллы, 3-5 из них засевают на комбинированную среду Ресселя или на двусахарный (лактоза, глюкоза) агар, а лучше на трехсахарный (лактоза, глюкоза, сахароза), "скошенный столбик" с мочевиной.

Высев колоний из чашек также делают на короткий пестрый ряд, включающий скошенный агар и среды Гисса с лактозой, глюкозой и сахарозой, а также на бульон Хоттингера для определения индола и сероводорода (в этих целях под пробку пробирки с бульоном вкладывают специальные индикаторные бумажки). Для определения подвижности культуры производят посев уколом в полужидкий агар (0,3-0,5%).

На среду Ресселя и "скошенный столбик" посевы делают сначала штрихом на скошенной поверхности, а затем уколом в глубину столбика. При разложении лактозы косая поверхность окрашивается в синий цвет (при индикаторе ВР). При разложении одной глюкозы окрашивается только столбик среды и происходит разрыв агара со скоплением в нем пузырьков газа. При разложении мочевины в "скошенном столбике" окраска среды меняется на оранжевую при индикаторе ВР и на коричнево-фиолетовую при индикаторе тимоловый синий в сочетании с индикатором Андраде. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37 °С 16-18 ч.

Культуры, ферментирующие лактозу, глюкозу и сахарозу с образованием газа и расщепляющие мочевины, отбрасывают. Культуры, не ферментирующие лактозу и сахарозу и не расщепляющие мочевины, подлежат дальнейшему исследованию. Изучают морфологию культуры в мазке, окрашенном по Граму, и подвижность (в виспячей или раздавленной капле или в полужидком агаре).

Культуры, представляющие грамтрицательные подвижные палочки, ферментирующие глюкозу с образованием газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, не разлагающие мочевины и не образующие индол, подвергаются серологическому исследованию - испытанию в реакции агглютинации на предметном стекле с набором агглютинирующих сывороток.

Для реакции агглютинации используют культуры, выращенные на среде Ресселя или на двусахарном или трехсахарном агарах. При этом для реакции агглютинации с О-сыворотками культуру следует брать из верхней части скошенного агара, а для агглютинации с Н-сыворотками - из самой нижней части (конденсационной воды), где микробы наиболее подвижны.

Исследование культуры начинают реакцией агглютинации с поливалентной адсорбированной О-сывороткой основных серологических групп А, В, С, D, E.

На предметное стекло наносят каплю сыворотки и культуры, тщательно смешивают и в течение 2 мин наблюдают склеивание (агглютинацию) частиц. Культуры, дающие положительную реакцию агглютинации с поливалентной сывороткой, также проверяют с монорецепторными агглютинирующими сыворотками. Сначала с помощью монорецепторных О-сывороток устанавливают принадлежность культур к той или иной серологической группе. Установив серологическую группу, к которой отнесена данная культура, последнюю проверяют монорецепторными Н-сыворотками сначала первой фазы, а потом второй, определяя таким образом серологический тип бактерий в соответствии со схемой Кауфмана-Уайта.

2.3. Метод "двойного центрифугирования"

2.3.1. Первый день исследования. К 100 г исследуемого корма, помещенного в стерильную колбу, добавляют 500 мл физиологического раствора, энергично взбалтывают в течение 5 мин и помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 6-8 ч колбу вынимают из термостата, встряхивают, затем содержимое отстаивают в течение 5-10 мин. Набирают 20-25 мл надосадочной жидкости, вносят в 4 центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 20 мин при 4000 оборотах в 1 мин.

Надосадочную жидкость из центрифужных пробирок удаляют и к осадку добавляют среды обогащения: Киллиана, Мюллера, жидкую среду Плоскирева (но не менее двух). После тщательного перемешивания пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С на 5-6 ч для подрачивания микрофлоры осадка. После этого пробирки вновь центрифугируют при тех же режимах.

Из центрифужных пробирок производят посевы на плотные дифференциально-диагностические среды: висмут-сульфит агар и среду Плоскирева, для чего из каждой пробирки материал отбирают пастеровскими пипетками и вносят на 2-3 чашки по 1-3 капли и равномерно распределяют его шпателем по всей поверхности среды. Засеянные чашки помещают в термостат.

К оставшемуся в центрифужных пробирках осадку добавляют ту же обогатительную среду, которая была удалена после центрифугирования, и продолжают инкубацию до следующего дня. Колбы с кормом после отбора необходимого количества материала оставляют в термостате также до следующего дня.

2.3.2. Второй день исследования. Из верхнего слоя обогатительных сред центрифужных пробирок (без встряхивания) и колб после 18-24-часового выдерживания в термостате при 37 °С производят посевы на плотные среды. Затем просматривают посевы, произведенные в первый день исследования. С выросшими на плотных средах колониями, подозрительными на сальмонеллы, проводят реакцию агглютинации на предметных стеклах с поливалентной сальмонеллезной О-сывороткой. Культуры, давшие положительную реакцию агглютинации, проверяют с монорецепторными О-сыворотками и устанавливают принадлежность культур к той или иной серологической группе.

Определение биохимических свойств культур проводят ускоренным методом, для чего применяют пастеровские пипетки, в которые насыщают каплю взвеси исследуемой культуры, а затем небольшое количество тех или иных углеводов. Результаты учитывают по ферментации углеводов после выдерживания пипеток в термостате при 37 °С в течение 2-3 ч.

2.3.3. Третий день исследования. Производят просмотр чашек с твердыми средами, засеянными во второй день исследования, и проверяют биохимические и серологические свойства выделенных культур для определения серологического типа бактерий в соответствии со схемой Кауфмана-Уайта.

2.4. Люминесцентный метод обнаружения сальмонелл

2.4.1. Из средней пробы берут 100 г корма, разводят стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 5 и выдерживают в термостате 6-8 ч при температуре 37 °С. Из полученной смеси готовят 2 мазка на обезжиренных стеклах нанесением суспензии бактериологической петлей на площадь 1 см², обозначенную восковым карандашом на обратной стороне. Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате, фиксируют этиловым спиртом 15 мин и ополаскивают дистиллированной водой в течение 5-10 с.

2.4.2. На высушенные мазки, помещенные на мостик бактериологических чашек с влажным тампоном (для предотвращения высыхания сыворотки), наносят 1-2 капли рабочего разведения люминесцирующей поливалентной сальмонеллезной сыворотки. При необходимости определения групповой принадлежности сальмонелл применяют групповые люминесцирующие сальмонеллезные сыворотки. Мазки выдерживают во влажной камере в течение 30 мин при комнатной температуре или 15 мин в термостате при 37 °С. Затем мазки дважды по 10 мин промывают 0,15 М раствором хлористого натрия, ополаскивают дистиллированной водой и вновь высушивают.

2.4.3. Окрашенные мазки заключают в смесь, состоящую из 9 частей глицерина и 1 части 0,15 М раствора хлористого натрия, накрывают покровным стеклом, на которое наносят каплю не флюоресцирующего иммерсионного масла или диметилфталата, и просматривают под люминесцентным микроскопом.

2.4.4. За положительный результат обнаружения сальмонелл считается наличие клеток соответствующей морфологии, у которых отмечается сияющая или яркая флюоресценция зеленого цвета периферии клеток с четко контрастируемой зоной по центру.

В качестве контроля берут сальмонеллезную культуру, наносят ее на предметное стекло и к ней добавляют люминесцирующую сыворотку.

2.5. Исследования на энтеропатогенные типы кишечной палочки

2.5.1. 50 г корма помещают в колбу, содержащую 500 мл стерильного физиологического раствора, встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30 мин и из полученной взвеси стерильными пипетками готовят разведения 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000, 1 : 100 000, 1 : 1 000 000. По 1 мл каждого разведения вносят в пробирки (по выбору) со средами: Эйкмана, Кесслера или Кода. Посевы помещают в термостат при температуре 43 °С для первых двух сред и при 37 °С для последней.

Через 24 ч учитывают рост - на среде Эйкмана по помутнению среды и образованию газа, на средах Кесслера и Кода по изменению цвета сред. Титр кишечной палочки устанавливают по наибольшему разведению, в котором еще наблюдался ее рост.

Из пробирок, где наблюдается рост микробов, производят посев на плотные дифференциально-диагностические среды: Эндо, Левина в бактериологических чашках, разделенных на секторы для каждого разведения.

Типичные колонии *E. coli* характеризуются круглой формой, гладкой, выпуклой или слегка приподнятой в центре поверхностью, ровными краями, розового, красного или малинового цвета с металлическим блеском или без него на среде Эндо или черного цвета на среде Левина.

2.5.2. Выросшие изолированные колонии S-формы (не менее 4) пересевают на МПБ, выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 16-24 ч. После этого одну часть пробирок используют для приготовления мазков, посева на дифференциально-диагностические среды, заражения мышей; вторую - для приготовления автоклавированного антигена, если кипяченный антиген не будет агглютинироваться поливалентными (комплексными) коолисыворотками.

У выделенных культур определяют морфологические и культурально-биохимические свойства с целью

проведения их родовой дифференциации, как указано в приложении 1.

Морфологию бактерий изучают в мазках, окрашенных по Граму, подвижность определяют по характеру роста в 0,3%-ном полужидком МПА.

2.5.3. Для определения культурально-биохимических свойств бактерий используют набор питательных сред, куда входят среды с углеводами и индикатором Андраде (лактоза, глюкоза, сахароза, маннит, дульцит, адонит, инозит), среда Кларка, цитратно-аммонийная среда, МПЖ, среда с мочевиной, МПБ или бульон Хоттингера и агар с глюкозой и сернокислым железом.

2.5.4. Патогенные свойства кишечной палочки определяют путем постановки биологической пробы на белых мышах. С этой целью внутрибрюшинно заражают трех мышей весом 14-16 г смывом с суточных агаровых культур в дозе 500 млн. микробных тел. Концентрацию бактерий устанавливают по бактериальному стандарту. Культуру признают патогенной в случае гибели одной или более мышей в первые 4 суток после заражения.

2.5.5. Одновременно с определением морфологических, культурально-биохимических и патогенных свойств бактерий проводят серологическую типизацию культур кишечной палочки по О-антигену с целью установления энзоотических типов.

Для приготовления антигена каждую предназначенную для типизации суточную агаровую культуру (пробирка со скошенным агаром) смывают стерильным физиологическим раствором хлористого натрия, доводят суспензию бактерий до концентрации 5-6 млрд/мл и кипятят в водяной бане в течение 1 ч. Вода должна полностью закрывать уровень культуры в пробирках.

На чистое обезжиренное стекло наносят пастеровской пипеткой по капле каждой комплексной О-сыворотки, разведенной физиологическим раствором 1:5, и по капле исследуемого антигена. Затем хорошо перемешивают стеклянной палочкой или петлей. Реакция протекает при комнатной температуре в течение 3 мин при покачивании стекла.

В том случае, когда антиген агглютинируется всеми комплексными сыворотками, его проверяют с физиологическим раствором для исключения самоагглютинации. Самоагглютинирующие антигены для серотипизации непригодны.

Антигены, давшие четко выраженную агглютинацию на стекле с комплексной колисывороткой, исследуют в капельной реакции агглютинации с отдельными разведенными 1 : 10 типоспецифическими сыворотками, входящими в состав комплексной сыворотки.

2.5.6. Если антиген из исследуемой культуры агглютинируется в капельной РА с одной или двумя-тремя моносыворотками, то его проверяют с этими же сыворотками в пробирочной РА, так как реакция на стекле имеет лишь ориентировочное значение.

Для постановки пробирочной РА типоспецифические О-сыворотки, агглютинирующие антиген из исследуемой культуры в РА на стекле, разводят физиологическим раствором, начиная с 1 : 100 до предельного титра сыворотки, указанного на этикетке, и во все пробирки добавляют по 2 капли антигена (концентрация 5-6 млрд. бактериальных тел по бактериальному стандарту), приготовленного из убитой нагреванием агаровой культуры обнаруженных бактерий.

Одновременно ставят контроли: 1. Антиген + физиологический раствор (для исключения самоагглютинации) и 2. Сыворотка, разведенная 1 : 100, без антигена (для исключения явления флоккуляции).

Штатив с пробирками встряхивают и ставят в термостат при 37 °С на 12-16 ч, затем выдерживают при комнатной температуре 18-24 ч. Реакция учитывается при помощи лупы или агглютиноскопа. Принадлежность к О-группе определяют по наивысшему разведению типоспецифической агглютинирующей сыворотки, вызывающей агглютинацию антигена исследуемой культуры, которое должно быть не ниже половины предельного титра типоспецифической сыворотки. Сыворотка и антиген в контроле не должны образовывать хлопьев.

2.5.7. Если все комплексные О-колисыворотки в капельной реакции не агглютинируют антиген из убитой нагреванием культуры, то готовят из этого штамма суспензию бактерий и автоклавируют ее при давлении пара 1 атм (120°) в течение 2 ч для разрушения термостабильного А-антигена. Автоклавируемый антиген исследуют с сыворотками 08, 09, 0101 как указано в пункте 2.5.5.

2.6. Исследования на анаэробы

2.6.1. 50 г корма растирают в стерильной ступке с физиологическим раствором и засевают в несколько пробирок со средой Китт-Тароцци, молоком и по две чашки со средами Вильсон-Блера и кровяным агаром по Цейслеру. Для уничтожения вегетативных форм по одной пробирке с жидкими средами прогревают при температуре 80 °С в течение 20 мин. Посевы помещают в термостат при температуре 37 °С. Чашки должны находиться в специальных аппаратах для анаэробных культур или в эксикаторе, куда заранее вносят тот или иной поглотитель кислорода.

2.6.2. Результаты посевов регистрируют в первый же день. Почернение среды Вильсон-Блера в течение 1-3 ч после посева, свертывание молока с образованием ноздревато-губчатого сгустка и прозрачной сыворотки в течение 6 ч, а также быстрое начало роста на среде Китт-Тароцци (через 4-5 ч) при обильном газообразовании является характерным для клостридиум перфрингенс.

Рост клостридиум ботулиnum, наблюдаемый обычно на 2-3-й день, характеризуется помутнением среды Китт-Тароцци, образованием осадка и запахом прогорклого масла.

При обнаружении роста на среде Китт-Тароцци производят микроскопическое исследование и выделение чистой культуры посевом на 2-3 чашки с кровяным агаром по Цейслеру, которые выдерживают в анаэробных условиях при температуре 37 °С в течение 24-48 ч, после чего просматривают рост в чашках и отбирают культуры, которые классифицируют по морфологическим и биохимическим свойствам, указанным в приложении 2 и 3.

Биологическую пробу проводят на морских свинках или белых мышах путем внутрибрюшинного заражения бульонной культурой. При положительном результате подопытные животные гибнут через 12-48 ч.

2.6.3. Для идентификации отдельных возбудителей или типов одного вида ставят опыт нейтрализации токсина специфической сывороткой. Для этого минимальную смертельную дозу культуры в смеси с 0,2-0,5 мл соответствующей типоспецифической сыворотки выдерживают в термостате 45 мин и вводят мышам внутрибрюшинно. Для контроля испытываемую культуру или фильтрат вводят мышам без сыворотки. Вид и тип микроба определяют по выживаемости мышей, получивших соответствующую сыворотку.

2.6.4. При исследовании кормов на ботулизм (наличие токсинов) в качестве подопытных животных используют белых мышей. При этом могут быть применены два способа:

а) нейтрализация токсина противоботулиновой сывороткой (антитоксином). Корм предварительно растирают в ступке со стерильным физиологическим раствором (1:4) и настаивают в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Настой центрифугируют и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. К 0,5 мл фильтрата добавляют 0,2 мл поливалентной противоботулиновой сыворотки. Смесь выдерживают 1 ч при комнатной температуре, затем одному животному вводят подкожно 0,5 мл фильтрата, другому - смесь фильтрата с сывороткой в той же дозе.

Аналогичное испытание может быть проведено с 6-7-суточной культурой, выращенной на печеночном бульоне. В этом случае пастеровской пипеткой отсасывают верхний слой культуры, который фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Далее поступают как указано выше;

б) разрушение токсина кипячением фильтрата. Фильтрат готовят как указано в подпункте "а" пункта 2.6.4. Одну половину фильтрата кипятят в течение 30 мин. Затем одному животному внутрибрюшинно вводят 0,5-1,0 мл не кипяченого фильтрата, другому - в этой же дозе прокипяченного.

2.6.5. Положительным результатом биологической пробы по первому и второму способам считают гибель мышей, наступившую как от фильтрата не обработанного противоботулиновой сывороткой, так и от фильтрата не подвергнутого кипячению.

3. ОЦЕНКА КОРМОВ

3.1. Комбикорма используют сельскохозяйственным животным при отрицательных результатах исследования на сальмонеллы, энтеропатогенные типы кишечной палочки и токсинообразующие анаэробы при условии его соответствия другим показателям действующих стандартов.

3.2. Мясо-костную и рыбную муку используют сельскохозяйственным животным при общей бактериальной обсемененности не более 500 тыс. микробных тел в 1 г и отрицательных результатах исследования на сальмонеллы, энтеропатогенные типы кишечной палочки и протей, а также токсинообразующие анаэробы при условии соответствия другим показателям действующих стандартов.

При обнаружении сальмонелл, энтеропатогенных типов кишечной палочки и протей корм запрещается использовать животным без дополнительной обработки. Вторичную стерилизацию проводят в соответствии с технологическими режимами производства этих кормов или же этот корм подвергается проварке при температуре не ниже 100 °С в течение 1 ч и дальнейшей обработке согласно установленному технологическому режиму приготовления кормов к скармливанию.

3.3. При установлении в кормах анаэробных микроорганизмов и их токсинов такие корма запрещается использовать животным без дополнительной термической обработки, которую проводят при температуре 120-130 °С в течение 2 ч. После стерилизации корма подвергают бактериологическому исследованию с постановкой биопробы на наличие анаэробов и их токсинов, и при получении отрицательных результатов они могут быть использованы на кормовые цели. При положительных результатах исследования эти корма уничтожают.

3.4. Корма, производство которых связано с тепловой обработкой, имеющие бактериальную обсемененность свыше 500 тыс. микробных клеток в 1 г при отсутствии патогенных микроорганизмов, подлежат повторной стерилизации согласно технологическим инструкциям или могут быть направлены для производства гранулированных кормов с термической обработкой, а также проварке, как указано в п.3.2. настоящих правил.

РЕЦЕПТЫ ОСНОВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

1. Селенитовая среда

Однозамещенный кислый селенистокислый натрий (без теллурита) NaHSeO_3	4,0 г
Пептон (чешский, венгерский или ГДР).....	5,0 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (безводный) NaHPO_4	7,0 г
Натрий фосфорнокислый однозамещенный (безводный) NaH_2PO_4	3,0 г
Лактоза.....	4,0 г
Вода дистиллированная.....	1000 мл

К дистиллированной воде добавляют фосфаты, пептон и лактозу, растворяют их и стерилизуют при 112 °С в течение 30 мин. Отдельно на стерильной дистиллированной воде готовят 10%-ный раствор кислого селенистокислого натрия, который добавляют к среде перед употреблением из расчета 0,4 мл на 10 мл среды. Готовая среда должна иметь рН 6,8-7,1.

2. Магниева среда

а) Пептон.....	4,2 г
Хлористый натрий.....	7,0 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный (безводный) KH_2PO_4	1,5 г
Дрожжевой экстракт.....	20,0 г
Вода дистиллированная.....	890 мл
Растворяют при кипении, затем добавляют растворы: б) и в).	
б) Хлористый магний кристаллический.....	36,0 г
Вода дистиллированная.....	90,0 мл
в) 0,1%-ный водный раствор бриллиантового зеленого.....	5,0 мл

Среду разливают в колбы и стерилизуют при 112 °С 20 мин.

Дрожжевой экстракт. 1 кг прессованных пекарских дрожжей распределяют равномерно в 2 л дистиллированной воды, прогревают в автоклаве при 100 °С 30 мин и оставляют отстаиваться в холодильнике при +4-5 °С в течение 4-5 суток. Надосадочную жидкость разливают во флаконы по 50-100 мл. На каждые 100 мл экстракта добавляют 1,25 мл 0,01%-ного водного раствора кристаллического фиолетового, вновь прогревают при 100 °С 30 мин в автоклаве.

Примечание. Экстракт можно готовить из сухих дрожжей, при этом на 1 кг сухих дрожжей необходимо брать 6 л дистиллированной воды. Готовый экстракт должен храниться в холодильнике.

3. Трехсахарный агар с мочевиной

На 100 мл питательного агара (рН 7,2-7,4) берут:

Лактозы.....	1,0 г
Сахарозы.....	1,0 г
Глюкозы.....	0,1 г
Мочевины.....	1,0 г
Соль Мора.....	0,02 г
Гипосульфита.....	0,63 г
Фенолового красного (фенолрота).....	0,4-0,6 мл

Все ингредиенты, кроме фенолрота, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды (10 мл) на водяной бане и вносят в расплавленный агар, фильтруют через марлю и доводят рН до 7,2-7,4. Затем добавляют фенолрот и разливают в пробирки по 5-6 мл. Стерилизуют в прогретом автоклаве при 0,5 атм. 20 мин.

4. Среда КОДА

Пептон.....	10,0 г
Лактоза.....	10,0 г
Хлористый натрий.....	5,0 г
Алкилбензолсульфонат.....	12,0 г
Бромкрезоловый пурпурный (1 : 100) (водно-спиртовой 1 : 1).....	2,0 мл
Метиленовая синь (1 : 1000).....	2,5 мл
Вода дистиллированная.....	1000 мл

Компоненты, за исключением красителей, растворяют в 1000 мл дистиллированной воды, доводят рН до 7,8-7,9 и кипятят 15-20 мин, после чего фильтруют через ватный фильтр и вносят растворы красителей. Разливают в пробирки и стерилизуют при 0,5 атм в течение 15-20 мин.

5. Среда Китт-Тароцци

Печень быка, телянка, лошади, кролика или морской свинки режут на кусочки по 1-3 г, смешивают их с тройным количеством обыкновенного нейтрального мясо-пептонного или хоттингеровского (1 : 8) бульона и кипятят 30 мин. Бульон фильтруют, кусочки печени на сите промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой или полотенцем. В пробирки помещают 3-4 г печени и 7-8 мл бульона, заливают 0,5 мл вазелинового масла и стерилизуют при 115 °С в течение 30 мин. Печень можно заменить кусочками мяса.

6. Кровяной агар по Цейслеру

К 3% МПА прибавляют 1% глюкозы, устанавливают рН 7,2 и разливают во флаконы по 100 мл, стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин. Перед употреблением к расплавленной и охлажденной до 45 °С среде прибавляют 20% свежезятой дифибринированной крови. Среду разливают в чашки Петри.

7. Среда Вильсон-Блера

100 мл 3% МПА с 1% глюкозы растапливают в водяной бане и добавляют 10 мл 20%-ного раствора сульфата натрия и 1 мл раствора 8%-ного хлорного железа. Оба раствора готовят на стерильной дистиллированной воде. Среду после изготовления не стерилизуют.

Приложение 1

Основные дифференциальные признаки бактерий семейства Enterobacteriaceae

Биохимические показатели	Escherichia (E. coli)	Citrobacter (C. freundii)	Klebsiella	Enterobacter			Proteus		Salmonella
				E. cloacae	E. aerogenes	E. liquefaciens	P. vulgaris	P. mirabilis	
Подвижность	+ или -	+ реже -	-	+	+	+	+	+	+ реже -
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Лактоза	+ или -	+ или -	+	+	+	(+)	-	-	-
Глюкоза	+ или -	+ или -	-	+	+	+	+	+ или -	+
Маннит	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Дульцит	+ или -	+ или -	+ или -	-	-	-	-	-	+ или -
Адонит	-	-	+	+ или -	+	-	-	-	-
Инозит	-	+ или -	+	-	+	(+)	-	-	+ или -
Индол	+ реже -	- или +	-	-	-	-	+	-	-
Сероводород	- реже +	+	-	-	-	-	+	+	+ реже -
Реакция с метилротом	+	+	-	-	-	+ или -	+	+	+
Реакция Фогес-Проскауэра	-	-	+	+	+	+ или -	-	+ или -	-
Усвоение цитратных аммонийных солей	-	+	+	+	+	+	+ или -	+ или -	+
Разложение мочевины	-	- или (+)	(+)	-	-	-	+	+	-
Разложение желатины	-	-	-	(+)	+ или -	+	+	+	+ или -

Примечание. + - положительный результат через 24-48 ч,

- отрицательный результат, (+) положительная реакция выражена слабо.

Приложение 2

Морфологические и культуральные свойства анаэробов

Название	Длина, мкм	Ширина, мкм	Подвижность	Капсулообразование	Спорообразование	Поверхностные колонии на кровяном агаре
<i>Cl. septicum</i>	2-10	0,8-1,1	+	-	Через 24-48 ч	Вуалевые с бахромчатыми краями и нежными отростками, бесцветные, незначительный гемолиз
<i>Cl. oedematiens</i>	5-10	1,1-1,5	+	-	Через 48 ч	Круглые, асбестовые или корневидные, бесцветные или серые, гемолиз
<i>Cl. histolyticum</i>	2-5	0,5-0,8	+	-	Через 24 ч	Мелкие, круглые, гладкие колонии, бесцветные или серые, без зоны гемолиза
<i>Cl. perfringens</i>	4-8	1,0-1,5	-	В организме животного и на свернутой сыворотке	Образуется только в средах богатых белком	Округлые, выпуклые, продолговатые, сочные колонии от серого до зеленого цвета, окружены большой зеленовато-коричневой зоной гемолиза
<i>Cl. botulinum</i>	4-9	0,5-1,2	+	-	Через 24-48 ч	Круглые или неправильной формы колонии с отростками, исходящими из мотка "переплетенных ниток". Колонии окружены зоной гемолиза

Примечание. + положительный результат,

- отрицательный результат.

Приложение 3

Название	Молоко	Желатин	Мозговая среда	Свернутая сыворотка
<i>Cl. septicum</i>	Медленное свертывание (2-5 дней), запах кислый	Разжижение через 3-5 дней	Нет почернения	Не разжижается. Инволюционные формы, споры
<i>Cl. oedematiens</i>	Медленное свертывание (4-10 дней)	Разжижение через 3-5 дней	Нет почернения	Не разжижается. Инволюционные формы, споры
<i>Cl. hystoliticum</i>	Свертывается через 1 сутки	Разжижается быстро	Почернение через 3-6 дней	Разжижается медленно
<i>Cl. perfringens</i>	Бурное свертывание (4-6 час.). Газообразование бурное, сыворотка прозрачная	Разжижение на 3-5-й день	Нет почернения	Не разжижается. Инволюционные формы, споры
<i>Cl. botulinum</i>	Пептонизируется	Разжижается	Чернеет медленно и слабо	Разжижается

Электронный текст документа
подготовлен ЗАО "Кодекс" и сверен по:
/ Минсельхоз СССР; Главное управление
ветеринарии. -
М.: "Колос", 1976