МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

ПРАВИЛА
бактериологического исследования кормов

МОСКВА «КОЛОС» 1976

gost.e-ecolog.ru

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

Утверждены Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 10 июня 1975 г.

© Министерство сельского хозяйства СССР, 1976

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 каждой упаковочной единицы
От 10 до 100	От 10 упаковочных единиц
От 101 и выше	От 100 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 изготовляется 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 : 10 000, 1 : 100 000, 1 : 1 000 000). После оседания взвешенных частиц из верхнего слоя жидкости делают посевы.

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

$$\frac{200 \times 10\,000 + 21 \times 100\,000 + 1 \times 1\,000\,000}{3} =$$

$$= 1{,}7 \text{ млн. микробных клеток.}$$

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 Килиана, 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 A 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 Гис-

са 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 мочевину, отбрасывают. Культуры, не ферментирующие лактозу и сахарозу и не расщепляющие мочевину, подлежат дальнейшему исследованию. Изучают морфологию культуры в мазке, окрашенном по Граму, и подвижность (в висячей или раздавленной капле или в полужидком агаре).

Культуры, представляющие грамотрицательные подвижные палочки, ферментирующие глюкозу с образованием газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, не разлагающие мочевину 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, Е.

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: Килиана, Мюллера, жидкую среду Плоскирева (но не менее двух). После тщательного перемешивания пробирки помещают в термостат при температуре 37° С на 5—6 ч для подращивания 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 инку-

бацию 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 насасывают 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-диагности-

ческие 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 кипяченый антиген не будет агглютинироваться поливалентными (комплексными) колисыворотками.

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 бактерийному 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 ки-

шечной палочки по О-антигену с целью установления эпизоотических 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 бактерийному 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. Автоклавированный 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 ботулинум, 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 испытуемую 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 протея, а также токсинообразующие анаэробы при условии соответствия другим показателям действующих стандартов.

При обнаружении сальмонелл, энтеропатогенных типов кишечной палочки и протея 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) [1]	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 pH 6,8—7,1.

2. Магниевая 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 дистиллиро-

ванной 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 (pH 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 pH 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-спиртовый 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 pH 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, теленка, 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 pH 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% свежевзятой 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 сульфита натрия и 1 мл раствора 8%-ного хлорного железа. Оба раствора готовят на стерильной дистиллированной воде. Среду после изготовления не стерилизуют.

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 и 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
Cl. septicum	2—10	0,8—1,1	+	—	Через 24—48 ч	Вуалевые с бахромчатыми краями и нежными отростками, бесцветные, незначительный гемолиз
Cl. oedematiens	5—10	1,1—1,5	+	—	Через 48 ч	Круглые, асбестовые или корневидные, бесцветные или серые, гемолиз
Cl. hystoliticum	2—5	0,5—0,8	+	—	Через 24 ч	Мелкие, круглые, гладкие колонии, бесцветные или серые, без зоны гемолиза
Cl. perfringens	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
Cl. botulinum	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.

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

ПРАВИЛА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОРМОВ

Редактор Т. А. Тихонова
Технический редактор Н. В. Карцева
Корректор А. А. Якимова

Сдано в набор 24/XI 1975 г. Подписано к печати 10/III 1976 г.
Формат 84×108¹/₃₂. Усл.-печ. л. 0,84 Уч.-изд. л. 0,98 Тираж 25000 экз.
Заказ № 45 Бесплатно

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Колос»,
103716, ГСП, Москва, К-31, ул. Дзержинского, д. 1/19

Московская типография № 32 Союзполиграфпрома при Государственном
Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии
и книжной торговли. Москва, К-51, Цветной бульвар, д. 26.

gost.e-ecolog.ru