

ПРАВИЛА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОРМОВ
(Утверждены Главным управлением ветеринарии
Министерства сельского хозяйства СССР 10 июня 1975 г.)

- 1. Отбор проб и составление среднего образца
- 2. Методы бактериологического исследования
 - 2.1. Определение общего количества микробных клеток.
 - 2.2.1. Метод последовательного обогащения.
 - 2.3. Метод двойного центрифугирования.
 - 2.4. Люминесцентный метод обнаружения сальмонелл.
 - 2.5. Исследования на энтеропатогенные типы кишечной палочки.
 - 2.6. Исследования на анаэробы.

3. Оценка кормов

Рецепты основных питательных сред

- 1. Селенитовая среда
- 2. Магниевая среда
 - 2.1. Дрожжевой экстракт
- 3. Трехсахарный агар с мочевиной
- 4. Среда КОДА
- 5. Среда Китта-Тароцци
- 6. Кровяной агар по Цейслеру
- 7. Среда Вильсона-Блера

Приложение 1. Основные дифференциальные признаки бактерий семейства Enterobacteriaceae

Приложение 2. Морфологические и культуральные свойства анаэробов

ПРАВИЛА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОРМОВ

(Утверждены Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства
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 таблице:

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 10 упаковочных единиц и дополнительно по
3	из каждых 100 упаковочных единиц

П р и м е ч а и е, 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. Масса первичной пробы должна 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 (масса) 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 : 1 000 000). После оседания взвешенных частиц из верхнего слоя жидкости делают посеvy.

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 в третьей - 1.

В эти чашки посев проводили из пробирок с разведениями соответственно - 1 : 10000, 1 : 100000, 1 : 1 000000. Следовательно, 1 г корма содержит:

$$\frac{200}{10\ 000} + \frac{21}{100\ 000} + \frac{1}{1\ 000\ 000} = 1,7 \text{ млн. микробов клеток.}$$

Определение общей бактериальной обсемененности мясо-костной муки можно проводить экспрессным методом с применением резазурина.

Для этого в стерильную пробирку помещают 1 г мясо-костной муки, взятой из среднего образца, добавляют 10 мл МПБ и встряхивают, а в другую пробирку для контроля вносят только 10 мл МПБ и помещают их в термостат при 40 С на 2 часа.

После этого в пробирки добавляют по 1 мл 0,01%-ного раствора резазурина и вновь выдерживают в термостате в течение двух часов.

Результаты реакции учитывают в этот период через каждые 30 минут. По восстановлению резазурина (изменение окраски от синего до розового цвета) определяют общую микробную обсемененность мясо-костной муки.

Если в пробирке с мясо-костной мукой наступает розовое окрашивание позднее 2 часов, это соответствует бактериальной обсемененности до 500 тыс. микробных клеток в 1 г продукта, а при окрашивании содержимого пробирки в розовый цвет до 2 часов - более 500 тыс.

Контролем служит пробирка с 10 мл МПБ и 1 мл 0,01%-ного раствора резазурина, выдержанная в термостате при том же температурном режиме и экспозиции

и без изменения цвета содержимого.

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 вносят 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 ставят в термостат при температуре 37 С. Через 16-18 часов производят посевы на бактериологические чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами: висмут-сульфит агар, среды 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-часового 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 часов.

На висмут-сульфит агаре *S. typhi* и *S. paratyphi A* растут в виде мелких, нежных, серовато-зеленых колоний с черным центром; *S. cholerae suis* - 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 - в виде прозрачных, бледных, нежно-розовых или розовато-фиолетовых колоний.

В случае обнаружения колоний, подозрительных на сальмонеллы, 3-5 из них засевают на комбинированную среду Рассела или на двухсахарный (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 среде Рассела 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 часов.

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, окрашенной по Граму, и подвижность

(в висячей или раздавленной капле или в полужидком агаре).

Культуры грамотрицательных подвижных палочек, ферментирующие глюкозу с образованием газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, не разлагающие мочевины и не образующие индол, подвергаются серологическому исследованию в реакции агглютинации на предметном стекле с набором агглютинирующих сывороток.

Для реакции агглютинации используют культуры, выращенные на среде Рассела или на двухсахарном или трехсахарном агаре. При этом для реакции агглютинации с O-сыворотками культуру следует брать из верхней части скошенного агара, а для агглютинации с H-сыворотками - из самой нижней части (конденсационной воды), где микробы наиболее подвижны.

Исследование культуры начинают реакцией агглютинации с поливалентной адсорбированной O-сывороткой основных серологических групп A, B, C, O, 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 O-сывороток устанавливают принадлежность культур к той или иной серологической группе, остановив серологическую группу, к которой

отнесена данная культура, последнюю проверяют монорецепторными H-сыворотками сначала первой фазы, а потом второй, определяя таким образом серологический тип

бактерий в соответствии со схемой Кауфмана - Увита.

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 минут и ставят в термостат при температуре 27 С. Через 6-8 часов колбу вынимают из термостата, встряхивают, затем содержимое отстаивают в течение 5-10 минут. Набирают 20-25 мл надосадочной жидкости, вносят в 4 центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 20 минут при 4000 об/мин.

Надосадочную жидкость из центрифужных пробирок сливают и к осадку добавляют среды обогащения Киллиана, Мюллера, жидкую среду Плоскирева (но не менее двух). После тщательного перемешивания осадка со средой пробирки помещают

в термостат при температуре 37 С на 5-6 часов для подрашивания 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 ка-

ждой 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 цент-

рифужных пробирок (без встряхивания) и колб после 18-24-часового выдерживания в термостате при 37 С производят посевы на плотные среды. Затем просматри-

вают посевы, произведенные в первый день исследования. С выросшими на плотных средах колониями, подозрительными на сальмонеллы, ставят реакцию агглютинации на предметных стеклах с поливалентной сальмонеллезной O-сывороткой. Культуры, давшие положительную реакцию агглютинации, проверяют с монорецепторными O-сыворотками и устанавливают принадлежность культур к той или иной серологи-

ческой 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 часов.

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 физиологиче-

ским раствором в соотношении 1:5 и выдерживают в термостате 6-8 часов при тем-

пературе 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 минут и ополаскивают дистиллированной водой в течение 5-10 секунд.

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 минут при комнатной температуре или 15 минут в термостате при 37 С. Затем мазки дважды по 10 минут 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 нефлюоресцирующего иммерсионного масла или диметилфталата, и просматривают под люминесцентным микроскопом.

2.4.4. Положительным результатом считается обнаружение сальмонелл, 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 минут и из полученной взвеси стерильными пипетками готовят разведения 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000. 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 часа 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 наблюдается 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 5-формы (не менее 4) пересевают на МПБ, выдерживают в термостате при температуре 37 С в течение 16-24 часов. 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 агглю-

тинироваться поливалентными (комплексными) коли-сыворотками.

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 Анд-

раде (лактоза, глюкоза, сахароза, маннит, дульцит, аденит, инозит), среда Кларка, нитратно-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 мышках. С этой целью внутрибрюшинно заражают трех мышей массой 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 четверо суток после заражения.

2.5.5. Одновременно с определением морфологических, культурально-биохимических и патогенных свойств бактерий проводят серологическую типизацию культур кишечной палочки по 0-антигену с целью установления энзоотических типов.

Для приготовления антигена каждую предназначенную для типизации суточную агаровую культуру (пробирка со скошенным агаром) смывают стерильным физиологическим раствором, доводят суспензию бактерий до концентрации 5-6 млрд/мл

и кипятят в водяной бане в течение 1 часа. Уровень воды должен быть выше уровня культуры в пробирках.

На чистое обезжиренное стекло наносят пастеровской пипеткой по капле каждой комплексной 0-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 минут 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 коли-сывороткой, исследуют в капельной реакции агглютинации (РА) 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 нагретым 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 часов,

затем выдерживают при комнатной температуре 18-24 часа. Реакцию учитывают с помощью 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-количесыворотки в капельной реакции не агглютинируют антиген из убитой нагретым агаром культуры, то готовят из этого штамма суспензию бактерий и автоклавировывают ее при давлении пара 1 атмосфера (120 С) в течение 2 часов для разрушения термостабильного А-антигена. Автоклавированный антиген исследуют с сыворотками 08, 09, 0101, как указано в п. 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 Китта-Тароцци, молоком и по две чашки со средами Вильсона - Блера и кровяным агаром по Цейслеру. Для уничтожения вегетативных форм по одной пробирке с жидкими средами прогревают при температуре 80 С в течение 20 минут. 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 Кильсона - Клера в течение 1-3 часов после посева, свертывание молока с образованием ноздревато-губчатого сгустка и прозрачной сыворотки в течение 6 часов,

а также быстрое начало роста на среде Китта - Тароцци (через 4-5 часов) при обильном газообразовании является характерным для клостридий перфрингенс.

Рост клостридий ботулинум, наблюдаемый обычно на 2-3-й день, характеризуется помутнением среды Китта - Тароцци, образованием осадка и запахом прогорклого масла.

При обнаружении роста на среде Китта - 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 часов, после чего просматривают рост в чашках и отбирают культуры, которые классифицируют по морфологическим и биохимическим свойствам, указанным - в приложении 2.

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

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 типа-

специфической сыворотки выдерживают в термостате 45 минут и вводят мышам внутривентриально. 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 час при комнатной температуре, затем одному животному вводят подкожно 0,5 мл фильтрата, другому - смесь фильтрата с сывороткой в той же дозе.

Аналогичное исследование 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" п. 2.6.4. Одну половину фильтрата кипятят в течение 30 минут. Затем одному животному внутривентриально вводят 0,5-1,0 мл некипяченого 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. Комбикорм 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 часа 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 часов. 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 С е л е н и т о в а я с р е д а

Однозамещенный кислый селенистокислый натрий (без теллурита) NaHSeO_3	4,0 г
Пептон (чешский, венгерский или ГДР).....	5,0 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (безводный) Na_2HPO_4 ...	7,0 г
Натрий фосфорнокислый однозамещенный (безводный) NaH_2PO_4	3,0 г
Лактоза.....	4,0 г
Вода дистиллированная.....	1000мл

К дистиллированной воде добавляют фосфаты, пептон и лактозу, растворяют их и стерилизуют при 112 С в течение 30 минут. 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. М а г н и е в а я с р е д а

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

Среду разливают в колбы и стерилизуют при 112 С 20 минут.

2. 1 . Д р о ж ж е в о й э к с т р а к т

1 кг прессованных пекарских дрожжей распределяют равномерно в 2 мл дистиллированной воды, прогревают в автоклаве при 100 С 30 минут 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 минут в автоклаве.

П р и м е ч а н и е. 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. Т р е х с а х а р н ы й а г а р с м о ч е в и н о й

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
соли Мора.....	0,02 г

гипосульфита натрия.....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 атмосферы 20 минут.

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 раствор 1:1).....2,0 мл
Метиленовый синий (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 минут, после чего фильтруют через ватный фильтр и вносят растворы красителей. Разливают в пробирки и стерилизуют при 0,5 атмосферы в течение 15-20 минут.

5. С р е д а К и т т а - Т а р о ц и

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 минут. 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 минут. Печень можно заменить кусочками мяса.

6. К р о в я н о й а г а р п о Ц е й с л е р у

К 3%-ному МПА добавляют 1% глюкозы, устанавливают рН 7,2 и разливают во флаконы по 100 мл, стерилизуют при 0,5 атмосферы в течение 30 минут. Перед употреблением к расплавленной и охлажденной до 45 С среде добавляют 20% свежей дефибринированной крови. Среду разливают в чашки Петри.

7. С р е д а В и л ь с о н а - Б л е р а

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

Биохимические показатели	Esche- richia (e.coli)	citrobac- ter (c.fre- undii)	klebsi ella	Ep*егоbac*ег 1	Рюлец5	7	8	9	10
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-	+	-	-	-	-	+	+	+реж-
Реакция с метилпротом	+	+	-	-	-	+или-	+	+	+
Реакция Фогес-Проскаэра	-	-	+	+	+	+или-	-	+или-	-
Усвоение нитратных и аммонийных солей	-	+	+	+	+	+	+или-	+или-	+
Разложение мочевины	-	-или(+)	(+)	-	-	-	+	+	-
Разложение желатины	-	-	-	(+)	+или-	+	+	+	+или-

Обозначения +положительный результат через 24-48 часов, -отрицательный резуль-
тат, (+) положительная реакция выражена слабо.

Приложение 2

Морфологические и культуральные свойства анаэробов

Поверхностные колонии Название кровяном агаре	Длина, микро- метров	Ширина, микро- метров	Подвиж- ность	Капсуло- образование	Спорооб- разование	на
<i>Cl.septicum</i> Ваулевые с бахромчатыми краями и нежными отростками, бесцветные, незначительный гемолиз	2-10	0.8-1,1	+	-	Через 24-48 часов	
<i>Cl.oedematiens</i> Круглые, асбестовые или корне- видные, бесцветные или серые,	5-10	1,1-1,5	+	-	Через 48 часов	
<i>Cl.hystoliticum</i> Мелкие, круглые, гладкие, бес-	2-5	0,5-0,8	+	-	Через 24 часа	цвет
<i>Cl.perfringens</i> Округлые, выпуклые, продол- говатые, сочные от серого до зеле- цвета, окружены большим	4-8	1,0-1,5	-	В организме животного и на свер-	Образуется только в средах, богатых белком ного	

зеленовато-коричневой зоной гемо- нутый сыво- лиза
 Cl.botulinum 4-9 0,5-1,2 + ротке - Через 24-48 часов
 Круглые или неправильной
 формы, с отростками, исходящими
 мотка переплетенных ниток, из

окружены зоной гемолиза

Название	Молоко	Желатин	Мозговая среда
Свернутая сыворотка			

Cl.septicum	Медленное свертывание	Разжижение через	Нет почернения
Не Разжижается. Инво-	(2-5 дней), запах кис-	3-5 дней	
люционные формы, споры	лый		
Cl.oedematiens	Медленное свертывание	Разжижение через	Нет почернения
Не Разжижается. Инво-	(4-10 дней)	(3-5 дней)	
люционные формы, споры			
Cl.hystoliticum	Свертывается через	Разжижается быстро	Почернение через
Разжижается медленно	одни сутки		3-6 дней
Cl.perfringens	Бурное свертывание	Разжиженне на 3-5-й	Нет почернения
Не разжижается.Инво-	(4-6 часов). Газообра-	день	
люционные формы, споры	зование бурное сыво-		
	ротка прозрачная		
Cl.botulinum	Пептонизируется	Разжижается	Чернеет медленно
Разжижается			слабо

П р и м е ч а н и е. + положительный результат; - отрицательный результат.