

УДК 619:579.834.115

А.П. МЕДВЕДЕВ, М.В. ГРИБАНОВА,

УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины"

АГАР-АГАР, МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ И ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЛЕПТОСПИР

Агар-агар получают из морских водорослей, которые тщательно промывают пресной водой, освобождают от механических примесей (песка, ракушек, моллюсков), высушивают на солнце, спрессовывают в тюки и отправляют на перерабатывающие заводы.

В биологической промышленности для изготовления агар-агара, используемого в микробиологической практике, применяют два основных метода: замораживание и диффузно-вакуумный. При применении первого метода сухие водоросли замачивают в известковом растворе, промывают пресной водой, а затем 2—3 раза варят в слабых растворах извести. Полученный отвар фильтруют, охлаждают до состояния студня, нарезают на тонкие кусочки, укладывают, промывают. Замороженный студень оттаивают, промывают и сушат на воздухе до получения сухой массы.

При диффузно-вакуумном методе сухие водоросли замачивают, варят 2—3 раза, фильтруют под давлением, охлаждают до получения студня.

Если агар-агар окрашен в темный цвет, его несколько раз промывают холодной водой до бесцветного и прозрачного состояния. После этого студень нагревают и сгущают в аппаратах под вакуумом, а затем высушивают на вальцевой сушилке, получая тонкую блестящую пленку сухого агар-агара.

Агар-агар представляет собой довольно сложное органическое соединение содержащее общего азота до 1 %, желозы 70—80 %, золы 2—4%. Это соединение в значительном количестве содержит углеводы, преимущественно полисахариды: гексозан-галактан ($C_6H_{10}O_4$) n, составляющий 20—25%, пептозаны ($C_6H_8O_4$) n — около 3%.

Основное вещество агар-агара, обладающее способностью превращаться в желе, представляет собой кальциевую соль кислого эфира серной кислоты и углеводного комплекса. Строение углеводного комплекса до конца не выяснено, но большинство исследователей полагают, что это полисахарид, в состав которого входит комбинация многих молекул арабины, глюкозы, галактозы и др.

Агар-агар обладает свойством расплавляться в воде при температуре 80—86°C и застудневать при 36—40°C. Благодаря этому он широко применяется в кулинарии и различных отраслях пищевой промышленности. Кроме этого, используют агар-агар в фармацевтическом производстве для изготовления пилюль, таблеток и других лекарственных форм.

Высокая стойкость агар-агара к действию микробов позволяет применять его в бактериологической практике при изготовлении полужидких и плотных питательных сред для культивирования микроорганизмов.

Прежде чем использовать агар-агар для приготовления питательных сред, контролируют его качество: определяют прозрачность и окраску студня, запах, содержание влаги, золы, прочность питательной среды, производят биологическую проверку.

Для определения прозрачности и окраски студня его готовят из 200 г раствора, содержащего 0,85% сухого агара. Навеску агара, взвешенную с точностью до 0,001 г, вносят в колбу, заливают дистиллированной водой, оставляют на

1 час, после чего нагревают на водяной бане до полного растворения агара. Расплавленный агар выливают в ванночку и оставляют при комнатной температуре для застывания на 3 часа, после чего из студня вырезают пластинки толщиной 10 мм. Пластинки помещают на бесцветное стекло, под которое кладут лист белой бумаги. Бесцветный, неокрашенный студень не меняет цвета находящейся под стеклом бумаги.

Для определения прозрачности студня его кладут на чистое прозрачное стекло, под которое помещают печатный текст. При прозрачном студне текст должен быть свободно читаем.

Сухой агар, а также 0,5%-й студень не должен иметь запаха.

Для определения содержания влаги в чистый, сухой, предварительно взвешенный стакан с притертой крышкой вносят 2—5 г агара и открытый стакан помещают в сушильный шкаф с температурой 102—105°C. Через 2 часа стакан извлекают из шкафа, закрывают крышкой, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Содержание влаги в агаре (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(a - b) \times 100}{a - в}$$

a — вес стакана с крышкой и агаром до сушки в г;

b — вес стакана с крышкой и агаром после сушки в г;

в — вес пустого стакана с крышкой в г.

Влажность агара не должна превышать 18%.

Содержание золы определяют следующим образом. В предварительно прокаленный фарфоровый тигель вносят 1,5—2,0 г агара. Содержимое тигля осторожно обугливают при постепенном повышении температуры до слабокрасного каления.

Содержание золы в агаре (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(a - б) \times 100}{в - б}$$

a — вес тигля с золой в г;

б — вес пустого тигля в г;

в — вес тигля с агаром в г.

Содержание золы в агаре не должно превышать 4,5%.

Определение прочности студня агара для бактериологических целей производят путем изготовления среды с содержанием агара 2—2,5%. В колбы-матрацы наливают 250—300 см расплавленного агара, дают ему остыть, а затем помещают колбы-матрацы в термостат при температуре 37—38°C на 24 часа. Если в течение этого срока агар не сползает со стенок колб, то такой агар по прочности студня считается качественным.

Для биологического контроля качества агара готовят плотную и полужидкую питательные среды.

Для получения плотной питательной среды к мясо-пептонному бульону добавляют 2 — 3 % испытуемого агара, а получения полужидкой — 0,15—0,4%. Приготовленные среды расфасовывают в пробирки, стерилизуют и засевают культурой рожи свиней или двумя видами микроорганизмов кокковой группы (*S. aureus*, *S. albus* или другими кокками).

Агар считают качественным, если засеянные микробы дают обильный и типичный рост при сохранении их биологических свойств.

Питательные среды имеют большое значение при диагностике инфекционных болезней животных и человека. От их качества зависит успех выделения чистой культуры микроорганизмов из исследуемого материала.

Для выделения чистой культуры при диагностике лептоспироза используют плотные питательные среды: Кокса, Канарейкиной, ВГНКИ и др. Известно, что лептоспиры весьма прихотливы к питательным средам. Потому мы особое внимание при приготовлении плотной питательной среды с применением корсаковского агара уделили проверке его качества вышеотмеченными методами.

Корсаковский агар имел светло-желтый цвет, без постороннего запаха, студень из агара в слое 10 мм был прозрачным с легкой опалесценцией без окраски, плотная питательная среда не сползала со стенок колб в течение 24 часов при выдерживании их в термостате при 37—38°C, влажность агара составила 17%, содержание золы в агаре — 4,2%.

Для биологической проверки агара использовали питательные среды, содержащие 2,5% этого соединения. На эти среды засеивали чистые культуры рожистых бактерий штамма ВР-2 и стафилококки *S. albus* и *S. aureus*. Засеянные среды культивировали в термостате при 37—38°C. Рост микробов контролировали визуально. Через двое суток на поверхности агара появились колонии, характерные для рожистой палочки и стафилококков.

Результаты контроля позволили оценить корсаковский агар как вполне качественный и пригодный для приготовления питательных сред.

Затем нами была приготовлена с использованием проконтролированного агара плотная питательная среда и испытана ее пригодность для культивирования лептоспир. В состав среды, кроме корсаковского агара, были включены сыворотка крови кролика, дистиллированная вода, гемоглобин, фосфатный буфер.

На приготовленную среду и среду ВГНКИ (контроль) была

засеяна культура лептоспир серотипа Tarassovi ВГНКИ-4, Canicola ВГНКИ-2.

Засеянные среды помещали в термостат и вели культивирование при 28—30°C. Рост лептоспирозной культуры контролировали визуально. На 8-е сутки культивирования на приготовленной нами среде появились мелкие, едва различимые глазом колонии микроорганизмов, которые к 12-му дню выращивания достигли размеров 1,5—2 мм в диаметре.

На среде ВГНКИ колонии лептоспир, различные визуально, появились несколько позже, т.е. на 9-е сутки культивирования, и достигли тех же размеров, что и на среде с корсаковским агаром на 13-е сутки выдерживания среды в термостате.

Колонии на среде с корсаковским агаром и на среде ВГНКИ (контрольной) представляли собой матовые, прозрачные, гомогенные диски с хорошо выраженным отчетливым краем. Из выросших колоний нами были сделаны расплодки микроорганизмов на сывороточной среде с последующим культивированием их при 28—30°C и ежедневным контролем роста путем темнопольевой микроскопии. На 7-е сутки выращивания накопление лептоспир составило 70—80 микробных тел в поле зрения микроскопа, что позволило использовать культуру для серологической типизации в реакции микроагглюцинации (РМА). РМА ставили согласно наставлению прилагаемого к набору лептоспирных агглютинирующих сывороток. Положительная РМА была зарегистрирована с сывороткой Tarassovi ВГНКИ-4 и Canicola ВГНКИ-2.

Результаты проведенной опытной работы позволяют заключить следующее. При приготовлении плотных питательных сред для культивирования микроорганизмов необходимо проводить контроль используемого агара, применяя только качественные серии этого соединения. Даже для таких прихотливых микроорганизмов, как лептоспиры, можно использовать для приготовления плотной питательной среды корсаковский агар, отвечающий минимальным требованиям, предъявляемым к его качеству.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Собалева Г.Л. Лептоспироз животных. Ярославль: ДИА-пресс, 2000. — 584 с.
2. Солонко А.А., Гласкович А.А., Алешкевич В.Н., Тимофеев Ф.Е., Федосова Н.Х. Практикум по общей микробиологии. Минск: Ураджай, 2000. — 280 с.

УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины"

организует музей истории ветеринарной медицины Беларуси.

Экспонаты направлять по адресу:

**210026, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11, академия ветмедицины,
музей истории академии.**

**Особо ценные экспонаты передавать через главных ветврачей районов
или нарочным.**