

Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины

А. А. Вербицкий, А. П. Медведев

**СРЕДСТВА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ
ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Монография

Витебск
ВГАВМ
2018

УДК 619:579 (07)
ББК 48.41

Вербицкий, А. А.

Средства для культивирования микроорганизмов при проведении лабораторных исследований : монография / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев. – Витебск : ВГАВМ, 2018 – 200 с.

ISBN 978-985-591-055-9.

В монографии сосредоточены основные сведения о питательных средах, применяемых в бактериологических исследованиях и санитарной микробиологии, представлены требования, предъявляемые к ним, описаны способы приготовления сред и определения их качества.

Монография предназначена для сотрудников научно-исследовательских и учебных учреждений, аспирантов, студентов, специалистов биологической и фармацевтической промышленности.

Табл. 5. Ил.12. Библиогр. 302 назв.

Рекомендовано к изданию редакционно-издательским советом УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» от 08.02.2018 г. (протокол № 1)

Авторы:

доктор ветеринарных наук, профессор *А. П. Медведев*,
кандидат ветеринарных наук, доцент *А. А. Вербицкий*

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор *П. А. Красочко*;
доктор ветеринарных наук, профессор *В. С. Прудников*

ISBN 978-985-591-055-9

©УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2018

Введение

Можно безапелляционно заявлять, что без микроскопической техники и питательных сред для культивирования микроорганизмов существование и развитие микробиологии как науки представить невозможно.

Действительно, питательные среды нужны для изучения биологических свойств микробов, выделения чистой культуры бактерий и ее идентификации, постановки достоверного диагноза на инфекционные болезни, хранения и поддержания ценных производственных и музейных штаммов, обеспечения учебного процесса в многочисленных учебных заведениях биологического профиля.

Производство специфических биопрепаратов диагностического, профилактического и лечебного назначения для ветеринарных и медицинских целей диктует необходимость надежного обеспечения производственных предприятий качественными питательными средами. Питательные среды, особенно жидкие, в больших объемах (тысячи литров) широко применяют в промышленной микробиологии при получении витаминов, ферментов, ростовых веществ, лимонной, уксусной, пропионовой и других кислот, ацетона, этанола и т.д.

Решение многих научно-исследовательских и практических задач в микробиологии тесно связано с вопросами получения питательных сред и культивирования микроорганизмов.

Успехи медицины и ветеринарии в борьбе с инфекционными болезнями во многом зависят от развития методов выделения, культивирования и идентификации их возбудителей, для чего в обязательном порядке нужны разнообразные качественные питательные среды.

Исключительно необходимы питательные среды для санитарной микробиологии, одной из основных задач которой является санитарно-бактериологическая оценка воды, воздуха, продуктов питания для людей, кормов для животных и т.д.

История получения и применения питательных сред начинается с классических работ Л. Пастера. В 1861 году ученый доказал, что брожение представляет собой процесс, связанный с жизнедеятельностью дрожжевых грибов, которые удовлетворяют свои физиологические потребности за счет бродящей жидкости, т.е. он положил начало культивированию в жидких средах. Немецкий ученый Р. Кох в 1883 году путем посева биоматериала на пластинки желатина разработал метод выделения чистых культур микробов. Годом спустя, микробиолог В. Хессе предложила плотную питательную среду, уплотнителем которой был использован агар-агар. Предложения этих ученых послужили основой для разработки, а затем промышленного выпуска и широкого практического использования жидких, полужидких и плотных питательных сред. Со времен Л. Пастера и Р. Коха было разработано и предложено большое количество сред для выращивания отдельных групп и видов микроорганизмов. В настоящее время насчитывают более 5000 прописей питательных сред. Универсальной питательной среды для всех видов микробов пред-

ложить никому не удалось, т.к. каждый вид обладает индивидуальными биологическими особенностями, которые определяют адекватные требования по отношению к среде для их культивирования.

Общей научно-теоретической основой для получения многочисленных питательных сред и культивирования бактерий является знание их физиологии.

Поэтому в данной монографии освещены важные вопросы, касающиеся физиологии микроорганизмов: их питание, дыхание, рост, размножение и другие.

В книге представлены общие сведения о питательных средах, предъявляемых к ним требованиях, дана классификация питательных сред, приготовление их из белоксодержащего сырья различного происхождения, описаны методы контроля качества сред, приведена рецептура питательных сред для отдельных групп микроорганизмов и другая информация относительно фильтрации, осветления, уплотнения сред и т.д.

В монографии затронуты вопросы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях и биологической промышленности, касающиеся оптимальных параметров выращивания бактерий.

В книге представлены питательные среды для исследования некоторых видов патматериала, для определения чувствительности микроорганизмов к антисептикам, определения колифагов в питьевой воде.

Значительное внимание уделено питательным средам для санитарно-бактериологической оценки пищевых продуктов и воды. В монографии приводится информация по применению определенных питательных сред для изоляции энтеробактерий, кластридий, листерий, стафилококков и других микроорганизмов из пищевых продуктов и воды. Особенно ценным является материал монографии, освещающий состав питательных сред и их ассортимент, что открывает возможность грамотного, целенаправленного использования сред в микробиологических исследованиях.

Необходимо заметить, что сведения о простых (основных) питательных средах в достаточном объеме имеются в многочисленных учебниках, практикумах по ветеринарной микробиологии и научных статьях. Однако, многие питательные среды, значимые в научном и практическом отношении, остаются неизвестными в связи с дефицитом информации о их ассортименте, составе и назначении. Известно, что микробиологическая практика опирается на относительно узкий круг питательных сред.

Данная монография призвана хотя бы частично восполнить недостающую информацию о питательных средах, их ассортименте, составе и назначении для изоляции определенных видов бактерий при исследовании биосубстратов различного происхождения.

Полагаем, что монография будет полезной для специалистов биологической промышленности, сотрудников научно-исследовательских учреждений, производственных лабораторий, преподавателей, аспирантов, студентов, вузов и колледжей ветеринарного, медицинского и биологического профилей.

ГЛАВА 1. Метаболизм микроорганизмов, их физиология – научно-теоретическая основа конструирования питательных сред для микробиологической практики

1.1. Метаболизм микроорганизмов

Метаболизм – это совокупность протекающих в микроорганизмах химических реакций превращения веществ и энергии и обмена ими с окружающей средой. Микроорганизмам присущ постоянный обмен веществ, который по сути является совокупностью двух взаимосвязанных противоположных процессов – катаболизма (диссимиляции) и анаболизма (ассимиляции). Катаболизм (энергетический обмен) представляет собой процесс расщепления сложных органических молекул до более простых промежуточных и конечных веществ. В процессе катаболизма углеводы, жиры и белки, поступающие извне или находящиеся в форме запасных веществ внутри клетки в серии сложных биохимических реакций, протекающих последовательно, распадаются до молочной кислоты, диоксида углерода, воды, аммиака. В результате этих реакций образуется свободная энергия, которая накапливается в форме высокоэнергетического соединения – аденозинтрифосфата (АТФ), а некоторая ее часть аккумулируется в водородных атомах кофермента никотинамидадениндинуклеотидфосфата, находящегося в восстановленной форме (НАДФН) [111,138,139,145,146]

Анаболизм (конструктивный обмен, биосинтез) – синтез из малых молекул-предшественников белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и других макромолекулярных соединений клетки с использованием свободной энергии. В основном источником ее получения является АТФ, а при синтезе некоторых клеточных компонентов, например, липидов – НАДФН [165, 180]

Метаболизм у микроорганизмов имеет свои особенности, к которым относят:

- быстрая адаптация к меняющимся условиям окружающей среды;
- многообразие используемых субстратов;
- интенсивность протекающих реакций;
- направленность всех процессов метаболизма на обеспечение и осуществление жизненно важных физиологических функций бактерий;
- преобладание процессов распада над процессами синтеза;
- наличие экзо- и эндоферментов метаболизма.

Процессы катаболизма и анаболизма, промежуточные реакции перестройки одних веществ в другие, называемые амфиболизмом, многообразные физиологические процессы осуществляются ферментами. По мнению А.И. Нетрусова и И.Б. Котова (2007), микроорганизмам требуется разное количество питательных веществ в среде их обитания для осуществления реакций метаболизма. Авторы, в качестве примера, указывают, что особенностью обмена веществ олиготрофов является низкая концентрация питательных веществ в окружающей среде и, напротив, высо-

кая концентрация их для копиотрофов, необходимых для роста и развития этих бактерий.

Вся совокупность химических реакций в клетках, по мнению голландского микробиолога А. Клейвера, подчиняется принципу биохимического единства. Сущность этого принципа заключается в том, что в биохимическом отношении все живые существа сходны, т.е. у них единообразие строительных блоков, единое высокоэнергетическое соединение в форме АТФ, универсальный генетический код, идентичны главные реакции метаболизма.

1.2. Химический состав бактерий, их физико-химические свойства

Изучение химического состава бактериальной клетки представляет большие трудности. Связано это с маленькими размерами бактерий, ничтожным количеством входящих в их состав веществ, изменчивостью клеток в зависимости от качества питательной среды, фазы размножения, влияния различных факторов окружающей среды. В выяснении химического состава бактерий решающую роль сыграли такие методы, как радиоизотопный, хроматография, электрофорез, серологические и цитохимические микрометоды.

Химический состав клеток микроорганизмов в общих чертах сходен с химическим составом клеток всех живых организмов. Все клетки состоят в основном из одних и тех же органических и минеральных веществ. Минеральные вещества представлены аналогичными элементами, но в различных соотношениях. Органические вещества состоят из одних и тех же компонентов и построены по единому принципу.

В клетках микроорганизмов из различных соединений синтезируются белки, нуклеопротеиды, углеводы, липиды, глицидолипидные, нуклеиновые кислоты, ферменты, витамины, ростовые и другие вещества.

Основной составной частью бактериальной клетки является вода. Клетка содержит 75-85% воды. В спорах бацилл и клостридий ее концентрация достигает 40-50%. Часть воды находится в свободном состоянии, а часть в связанном. Свободная вода служит дисперсионной средой для коллоидов и растворителем для многих веществ, источником водородных и гидроксильных ионов. Гидролитические процессы расщепления белков, углеводов и липидов происходят в результате присоединения к ним воды. Без воды не могут протекать процессы дыхания, развития и размножения микроорганизмов. В гипертоническом растворе происходит потеря воды клеткой, наступает отслоение протоплазмы от клеточной стенки – плазмолиз. Напротив, в гипотоническом растворе бактериальная клетка набухает, увеличивается в размере, в результате наступает ее разрыв – плазмолиз. Высушивание приостанавливает процессы метаболизма. Установлено, что большинство видов микроорганизмов хорошо переносят высушивание. Высушивание в вакууме из замороженного состояния

(лиофилизация) прекращает размножение микробов и способствует сохранению их биологических свойств в течение длительного времени.

Сухое вещество микробной клетки составляет 15-25%. В процентном отношении к сухому веществу бактерии содержат: углерода - 45-55%, азота - 8-15%, кислорода - 30%, водорода - 6-8%. Кроме четырех органических элементов (С, N, O, H) в состав микробных клеток входят зольные соединения, т.е. минеральные вещества, составляющие от 3 до 10% сухого вещества микробов: фосфор, сера, магний, натрий, калий, кальций и другие. Кроме макроэлементов, бактерии содержат и микроэлементы: молибден, кобальт, бор, марганец, цинк, медь и ряд других элементов. Макро- и микроэлементы участвуют в регуляции осмотического давления, рН среды, окислительно-восстановительного потенциала, активизируют процессы дыхания, роста, размножения, входят в состав ферментов, витаминов и структурных компонентов клетки. Химические элементы образуют органические вещества: белки, углеводы, липиды и другие.

Основные физиологические функции органических элементов важнейших макро- и микроэлементов представлены в таблице 1 (по М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич, 2008)

Структурными компонентами клеток животных, растений, бактерий и вирусов являются белки. Они представляют собой высокомолекулярные биологические полимерные соединения, образующие при гидролизе аминокислоты. Белки составляют 40-80% сухой массы бактерий. В состав клетки входит два основных их вида: протеины и протеиды. Протеины – простые белки (альбумины, глобулины, гистоны и др.), протеиды – сложные белки (нуклеопротеиды, липопротеиды, гликопротеиды и др.). Простые белки при гидролизе распадаются на аминокислоты. Сложные белки представляют собой соединения простых белков с различными небелковыми веществами. Белки выполняют различные функции – каталитическую, двигательную, транспортную, защитную, гормональную, запасную и другие. Белки бактериальной клетки обуславливают антигенность, вирулентность, иммуногенность и видовую принадлежность микроорганизмов.

В состав микробов входит диаминопимелиновая кислота (ДАП), которая отсутствует в клетках человека и животных. Бактерии содержат более 2000 различных белков, входящих в структурные компоненты и обеспечивающих процессы метаболизма.

В цитоплазме бактерий в свободном состоянии обычно содержатся все необходимые для синтеза белка аминокислоты. Общее количество свободных аминокислот достигает 200-500 мг на 1 г клеток. Они имеют как экзогенное, так и эндогенное происхождение. Большинство бактерий сами способны синтезировать все необходимые аминокислоты, некоторые виды такой способностью не обладают и нуждаются в готовых аминокислотах, которые должны быть в питательной среде. Степень потребности в готовых аминокислотах у разных видов бактерий различна. Аминокислоты необходимы всем микроорганизмам для синтеза белка и дру-

гих соединений, а для некоторых бактерий они служат источником энергии. [221, 223]

Таблица 1 - Основные физиологические функции важнейших элементов

Элемент	Физиологическая функция
Углерод	Входит в состав всех органических веществ клетки
Кислород	Входит в состав воды, органических веществ клетки; в виде O ₂ является акцептором электронов при аэробном дыхании
Азот	Входит в состав белков, нуклеиновых кислот, коферментов
Водород	Входит в состав воды и всех органических веществ клетки
Фосфор	Входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов, участвует в процессе дыхания (образование АТФ)
Сера	Входит в состав белков (в аминокислотах, цистеине и метионине) и некоторых коферментов (КоА, кокарбоксылазы и др.)
Калий	Один из главных неорганических катионов клетки, кофактор для некоторых ферментов
Кальций	Важный катион клетки, кофактор для некоторых ферментов (например, протеиназа)
Магний	Важный катион клетки; неорганический кофактор для многих ферментативных реакций, в том числе для реакций с участием АТФ; участвует в связывании ферментов с субстратами
Железо	Входит в состав цитохромов и других белков, кофактор для некоторых ферментов
Марганец	Неорганический кофактор для некоторых ферментов, иногда может заменить магний
Кобальт	Входит в состав витамина В ₁₂ и его производных, являющихся коферментами
Медь, цинк, молибден	Неорганические компоненты некоторых ферментов

Содержание нуклеиновых кислот в бактериальной клетке зависит от вида бактерий, питательной среды и колеблется в диапазоне 10-30% от сухого вещества. [194] Известны три типа рибонуклеиновой кислоты: рибосомальная (р РНК), транспортная (т РНК), матричная (м РНК). Рибосомальная РНК входит в состав рибосом, транспортная – переносит аминокислоты к рибосомам, матричная – обеспечивает включения аминокислот в молекулу полипептидной цепи. Кроме рибонуклеиновых кислот, бактериальная клетка содержит дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). ДНК состоит из аденина, гуанина, цитозина, тимина, фосфорной кислоты, дезоксирибозы, а РНК – аденина, гуанина, цитозина, фосфорной кислоты, рибозы. Считают, что РНК преимущественно содержится в рибо-

сомах, а ДНК - в нуклеоиде клетки. ДНК является носителем наследственности бактерий. [106, 107, 108, 110]

В состав различных клеточных структур бактерий входят углеводы и многоатомные спирты. Углеводы состоят из углерода, водорода и кислорода, некоторые содержат азот. Их подразделяют на две группы: моносахариды (глюкоза, фруктоза) и полисахариды (сахароза, мальтоза, крахмал и др.), полисахариды делят на два порядка. Представители первого порядка – белые кристаллические вещества, легко растворяются в воде (например, сахароза), а второго порядка – сложные вещества с большим молекулярным весом либо совсем не растворимы в воде, либо дают вязкие, коллоидные растворы (крахмал, гемицеллюлоза, агар-агар). [112, 117, 126, 138]

Содержание углеводов в бактериях составляет 17-18% от сухого вещества. Углеводы служат структурными компонентами клеточной оболочки и капсулы, выполняют роль запасных питательных веществ. С наличием полисахаридов в микробной клетке связаны серологическая специфичность и вирулентность микробов. Большинство грамположительных микроорганизмов содержат растворимые полисахариды, которые способны вступать в серологические реакции, но не способны вырабатывать при попадании в организм животного антитела, т.е. они являются гаптенами. У грамотрицательных бактерий специфические полисахариды обладают антигенными свойствами, равноценны соматическим антигенам микроорганизмов. Входящие в состав капсулы полисахариды имеют важное иммунологическое значение, сообщая близкородственным микроорганизмам типовую специфичность. Полисахариды и моносахариды служат источником энергии для бактерий и углевода для синтеза новых соединений.

Бактериальные клетки содержат липиды – истинные жиры и липоиды – жироподобные вещества. Некоторые виды микробов содержат липиды в значительном количестве. Так, у риккетсий, дрожжей, грибов, микобактерий их содержится до 40%, а у других видов их содержание не превышает 3-7%. Липиды состоят из свободных жирных кислот (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и др.), нейтральных жиров, восков и фосфолипидов. Фосфолипиды – сложные эфиры высших спиртов и кислот, содержащие азот, фосфор. Они обуславливают токсичность микробов.

Воски представляют собой жироподобные вещества, твердые при обычной температуре. Много воска (до 11%) содержат кислотоустойчивые микробы.

Липиды выполняют роль запасных веществ, но могут быть использованы клеткой как исходные компоненты для синтеза белков. Бактерии обладают определенной плотностью, вязкостью, эластичностью, осмотическим давлением, проницаемостью бактериальной клетки. [145, 146, 147]

Плотность бактерий равна в среднем 1,055. Цитоплазма бактери-

альной клетки обладает определенной вязкостью, которая колеблется в широких пределах и превышает вязкость воды в 3-800 и более раз. Различные физические и химические факторы могут вызвать обратимую и необратимую коагуляцию цитоплазмы, повышать ее вязкость и увеличивать окрашиваемость бактерий. Цитоплазма представляет собой коллоидный золь, а поверхностные структуры находятся в состоянии геля, чем и объясняют эластичность микробов. Осмотическое давление у бактерий примерно в 2 раза ниже, чем у клеток высших животных. В результате постоянного притока воды в клетку, коллоиды ее находятся в набухшем состоянии, и поэтому цитоплазма плотно прилегает к оболочке. Это явление получило название тургора бактериальной клетки. Осмотическое давление у бактерий не превышает $6 \cdot 10^5$ Па. [165]

Внутриклеточное осмотическое давление у бактерий колеблется в пределах 3-6 атмосфер, т.е. в два раза ниже, чем у клеток млекопитающих. В старых клетках грамотрицательных бактерий оно составляет 2-3 атмосферы, а в молодых растущих клетках, например *E. coli*, давление может достигать 15 атмосфер. [165, 180]

Способность веществ проникать внутрь бактерий зависит от условий среды и физиологического состояния самой клетки. Молодые клетки характеризуются большей проницаемостью, чем старые. Высокая проницаемость молодых бактерий обуславливает их повышенную чувствительность к различным антисептикам. Максимальная проницаемость у бактерий возникает после их гибели, что учитывают при окрашивании препаратов для микроскопии.

При внесении бактерий в гипертонический раствор поваренной соли наблюдают явление плазмолиза, выражающегося в сморщивании протоплазмы и отделении ее от клеточной оболочки. Объясняется это выходом воды из бактериальной клетки. Напротив, при внесении бактерий в гипотонический раствор, наблюдают набухание клетки и ее разрыв вследствие поступления воды в цитоплазму бактерии, это явление называется плазмолизом. [144, 180, 186]

1.3. Типы питания и дыхания бактерий

Микроорганизмам, как и всем живым существам, присуща такая жизненно необходимая функция, как питание. В процессе питания клетки получают вещества, идущие на синтез клеточных компонентов, а также служащие источником энергии для всех процессов жизнедеятельности.

Животные и простейшие способны заглатывать плотные и жидкие частицы пищи. У них пища подвергается перевариванию под действием гидролитических ферментов. У многоклеточных животных это происходит в желудочно-кишечном тракте, а у одноклеточных – в пищеварительных вакуолях. Такой способ питания получил название голозойного.

Бактерии, дрожжи, плесени, микоплазмы не имеют желудочно-кишечного тракта, пищеварительных органов или органелл. Питательные

вещества в виде небольших молекул в водном растворе проникают в микроорганизм через поверхность тела. Этот способ питания получил название голофитного.

Бактериальная клетка за сутки потребляет «пищи» в 20 раз больше веса своего тела. Это свидетельствует об интенсивном обмене веществ у микробов. Питательные вещества поступают в бактериальную клетку через всю ее поверхность, что способствует быстрому обмену веществ между микроорганизмом и средой. Проникновение питательных веществ в клетку основано на явлениях осмоса и диффузии. Необходимым условием проникновения веществ в клетку является их растворимость в воде. В микробную клетку могут поступать только вещества, находящиеся в растворенном виде. Вещества, не растворимые в воде, а также дающие коллоидные растворы (белки, жиры, полисахариды) диффундировать в клетку не могут. Поэтому микробы синтезируют и выделяют во внешнюю среду экзоферменты, которые производят их гидролиз до более простых и растворимых в воде соединений.

Например, крахмал расщепляется ферментом амилазой до мальтозы. Белковые вещества под действием протеаз расщепляются до аминокислот, липоиды расщепляются до глицерина и жирных кислот. В результате гидролиза получают вещества, обладающие малыми размерами молекул, растворимые в воде, и поэтому они могут проникать через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану в цитоплазму клетки.

Проникновение минеральных солей в клетку зависит от степени диссоциации их на ионы, рН среды, заряда цитоплазматической мембраны. Если цитоплазматическая мембрана имеет положительный заряд, то в бактерию легко проникают ионы с отрицательным зарядом. Поступление питательных веществ в клетку является сложным процессом и осуществляется различными путями.

Питательные вещества в зависимости от выполняемых функций делятся на две группы:

- 1) источники энергии;
- 2) конструктивные материалы.

К первой группе относятся вещества, выделяющие при окислительно-восстановительных реакциях энергию. Это углеводы, спирты и другие соединения.

Ко второй группе относят вещества, используемые клеткой для синтеза различных клеточных структур. Это в основном аминокислоты. Вещества второй группы всегда присутствуют в цитоплазме клетки в свободной или связанной форме. Многие вещества выполняют двойную функцию. Их можно отнести к обеим группам. Например, глюкоза используется бактерией в основном как источник энергии, однако она может служить материалом для синтеза многих углеродсодержащих компонентов клетки. Аминокислоты, в первую очередь, идут на построение белка, но могут служить источником энергии. Они являются источником азота, углерода, входят в состав ростовых веществ. Исходя из потребно-

стей микробов в аминокислотах, их условно разделяют на две группы:

1) необходимые аминокислоты, обязательные для роста и развития бактерий, например, глутаминовая, аспарагиновая;

2) несущественные аминокислоты, не оказывающие решающего влияния на развитие микроорганизмов, например, пролин, треонин.

Необходимо заметить, что функции указанных групп аминокислот могут меняться в зависимости от видовой принадлежности микробов.

Бактерии и плесени не имеют вкусовых желез и с одинаковой жадностью «поедают» железнодорожные шпалы, панцири крабов, испражнения, кожу, бумагу, резину и т.д. Можно утверждать, что микробы всеядны, едят парафин, фенол, хитин, они разрушают все на своем пути. Для этого им нужно время и соответствующее «ферментное оснащение». Некоторые микроорганизмы процветают в карболовой кислоте, керосине и мыле. Наоборот, другие чрезвычайно «привередливы» и способны расти лишь на особых питательных средах.

Широкому распространению микроорганизмов способствует разнообразие типов питания. Микробам для обеспечения своей жизнедеятельности необходимы, в первую очередь, такие элементы, как С, О, Н, N, S, P, R, Ca, Mg, Fe. Пожалуй, самыми важными для бактерий являются С и N. Микроорганизмы могут получать С из неорганических и органических углеродсодержащих соединений. В связи с этим их делят на две большие группы.

1) аутоотрофы (от греч. *auto* - сам, *trophie* – питающийся);

2) гетеротрофы (от греч. *hetero* – другой, *trophe* – пища).

С учетом источника энергии, доноров–электронов разделяют на: 1) хемолитотрофы; 2) фотолитотрофы; 3) хемоорганотрофы; 4) фотоорганотрофы.

Аутоотрофы – микробы, способные синтезировать сложные органические вещества – белки, жиры, углеводы, витамины, ферменты и другие – из простых органических веществ – углекислоты, аммиака, нитратов и других неорганических солей. Аутоотрофы способны использовать углерод из углекислоты (СО₂).

Аутоотрофы подразделяются на: 1) хемолитотрофов; 2) фотолитотрофов.

Хемолитотрофы – получают углерод из диоксида углерода (СО₂) и создают органическое вещество при помощи энергии, освобождающейся в процессе окисления некоторых минеральных соединений.

Фотолитотрофы (цианобактерии, пурпурные микробы, серобактерии), так же, как и растения, синтезируют органические вещества, используя углерод из СО₂ воздуха и энергию солнца. Фотолитотрофы содержат пигменты, близкие по своему составу к хлорофиллу растений.

Среди аутоотрофов есть микробы, способные усваивать углерод из СО₂ и органических соединений. Они получили название миксотрофы.

Гетеротрофы – это микроорганизмы, которые для своего развития нуждаются в готовых органических соединениях. Органические вещества

служат для них источником энергии и пластического материала. Гетеротрофов подразделяют на:

- 1) фотоорганотрофов;
- 2) хемоорганотрофов.

Фотоорганотрофы – необходимую энергию получают не только от солнца, но и в результате окисления органических веществ.

Хемоорганотрофов подразделяют на метатрофов, или сапрофитов (*sapros* – гнилой, *phytos*- растение), и паратрофов, или паразитов (греч. *parasitos* – нахлебник).

Сапрофиты – это гнилостные микробы, питающиеся мертвой тканью животных и растений. Сапрофиты, как правило, живут за счет инертных органических веществ и обычно не играют роли в возникновении инфекционных болезней.

Паратрофы, или паразиты, используют для питания органические соединения живых организмов и ведут паразитический образ жизни. Это возбудители инфекционных болезней (Н.И. Смирнова, 1979; В.Д. Тимаков, В.С. Ливашев, Л.Б. Борисов, 1983; С.А. Павлович, 2005 и мн. другие).

Для синтеза азотсодержащих соединений – аминокислот, пуринов, пуримидинов, некоторых витаминов и других макромолекул – микроорганизмы нуждаются в доступном источнике азота. Гетеротрофные микроорганизмы используют различные азотсодержащие соединения. Одна группа гетеротрофов способна усваивать молекулярный азот воздуха (азотфиксирующие бактерии) или неорганический азот из солей аммония, нитратов или нитритов. Гетеротрофы другой группы одни азотсодержащие соединения синтезируют из солей аммония, а другие могут ассимилировать только в готовом виде. Способность микроорганизмов синтезировать то или иное соединение в конечном итоге определяется наличием в его геноме соответствующих генов, контролирующих образование определенных ферментов (В.Д. Тимаков, В.С. Ливашев, 1983).

По способу усвоения азотистых веществ микроорганизмы разделяют на следующие группы:

- 1) протеолитические, способные расщеплять нативные белки, пептиды и аминокислоты;
- 2) дезаминирующие, способные разлагать только отдельные аминокислоты, но не белковые вещества;
- 3) нитритно–нитратные, усваивающие окисленные формы азота;
- 4) азотфиксирующие, способные питаться атмосферным азотом (Н.М. Колычев, 1991).

В качестве универсального источника азота и углерода в питательных средах для патогенных микробов служат пептоны. Потребность бактерий в зольных элементах незначительна. Минеральные соли (сера, фосфор и др.) обычно всегда имеются в питательной среде. Серу бактерии усваивают из сульфатов или аминокислот (цистин, цистеин). Источником фосфора служат различные фосфорнокислые соли. Такие элемен-

ты, как калий, магний, железо бактерии получают из различных солей. Калий является необходимым элементом для жизнедеятельности микробов, однако его роль в жизни бактерий полностью не выяснена. Магний активирует разные ферментные системы бактерий. Считают, что микроэлементы бор, цинк, кобальт и др. служат стимуляторами роста микробов (Н.М. Колычев, 1991; С.А. Павлович, 2005).

Проникновение веществ в бактериальную клетку происходит:

1) путем простой диффузии веществ, образующих истинные растворы; перемещение веществ происходит вследствие разницы их концентрации по обе стороны цитоплазматической мембраны. Простая диффузия осуществляется без затраты энергии;

2) путем облегченной диффузии, которая осуществляется в результате разницы концентрации веществ по обе стороны цитоплазматической мембраны. Однако этот процесс происходит с помощью молекул – переносчиков, локализующихся в цитоплазматической мембране и обладающих специфичностью. Каждый переносчик транспортирует через мембрану определенное вещество или передает его другому компоненту цитоплазматической мембраны – собственно переносчику. Белками–переносчиками могут быть пермеазы, осуществляющие активный транспорт органических молекул–моносахаридов, аминокислот, нуклеотидов и др. из внешней среды во внутреннюю. Место синтеза пермеаз – цитоплазматическая мембрана. Облегченная диффузия протекает без затраты энергии;

3) путем активного транспорта веществ, который происходит с помощью пермеаз и направлен на перенос веществ от меньшей концентрации в сторону большей, т.е. как бы против течения, поэтому данный процесс сопровождается затратой метаболической энергии (АТФ), образующейся в результате окислительно-восстановительных реакций в клетке (А.А. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.М. Рыбакова, 1998; А.А. Солонко, А.А. Гласкович, П.А. Красочко, А.П. Лысенко, Н.Н. Андросик и др., 2002).

Под термином «дыхание» следует понимать все окислительно-восстановительные процессы бактериальной клетки, связанные с освобождением энергии в виде аденазинтрифосфорной кислоты – универсального аккумулятора химической энергии. Дыхание – это эволюционно наиболее совершенный способ получения энергии. Его совершенство в том, что энергия используемого субстрата утилизируется наиболее полно.

У высших животных и человека акт дыхания довольно аналогичен и однообразен. Суть его заключается в окислении органических веществ внутри тела. У млекопитающих кислород воздуха поглощается в легких гемоглобином крови, происходят окислительные реакции, конечным продуктом которых является углекислота, выделяемая организмами.

Легкие млекопитающих и человека имеют сложное и совершенное строение, обеспечивающее достаточное насыщение кислородом всех клеток тела. Совершенный газообмен поддерживает постоянство внутренней

среды организма, что дает возможность млекопитающим и человеку обитать в различных климатических условиях (Н.С. Мотузко, В.В. Ковзов, В.К. Гусаков, 2004).

Микроорганизмы же отличаются многообразием типов дыхания. Некоторые виды бактерий, подобно млекопитающим, поглощают кислород и выделяют углекислоту, другие же, поглощая кислород, не доводят реакции окисления до конца и поэтому углекислота не выделяется. Например, уксуснокислые бактерии окисляют этиловый спирт и уксусную кислоту. Плесневые грибы окисляют сахар до образования шавелевой или лимонной кислоты. Известны микроорганизмы, дыхание которых заключается в окислении неорганических соединений. Так, нитробактерии получают энергию при окислении аммиака, железобактерии – железа, серобактерии – при окислении серы. Многие виды бактерий добывают энергию не путем кислородного дыхания, а расщепления органических веществ в отсутствие свободного кислорода. Дыхание у этих микробов называют анаэробным или брожением. Анаэробное дыхание было открыто Луи Пастером. В 1861г. он впервые опубликовал свои наблюдения о существовании особого анаэробного микроба *Vibrio butyricus*, сбраживающего молочнокислый кальций с образованием масляной кислоты. Во времена Пастера считали, что без кислорода нет жизни. Пастер опроверг это мнение. Он писал: «Жизнь возможна и без кислорода, за счет брожения. Брожение есть способ существования бактерий без воздуха».

Процессы разложения органических веществ при бескислородном дыхании, сопровождающиеся выделением энергии, носят техническое название – брожение. Брожением в широком смысле слова называется процесс, при котором происходят химические изменения в любом органическом субстрате под влиянием ферментов, вырабатываемых специфическими микроорганизмами (П.А. Буланов, О.И. Колешко, 1969). При брожении происходит ферментативное расщепление органических соединений (преимущественно углеводов) в анаэробных условиях. По конечному продукту расщепления углеводов различают спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое и другие виды брожения (А.А. Воробьев, А.С. Быков, М.Н. Бойченко и др., 1999).

Процесс, в котором атомы или молекулы теряют электроны, называется окислением, а обратный процесс – присоединение электронов – восстановлением. Перенос электронов сопровождается высвобождением энергии, которая в виде аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинотрифосфата (АТФ) накапливается в микробной клетке и расходуется по мере необходимости на ее нужды.

Окисление биологического субстрата микроорганизмами может происходить по типу прямого и непрямого окисления, или дегидрогенирования.

Прямое окисление осуществляется при непосредственном окислении вещества кислородом воздуха или путем дегидрирования, т.е. отнятия от субстрата водорода. Прямое окисление типично для большинства

сапрофитных микроорганизмов. У некоторых микробов происходит частичное аэробное окисление. При неполном окислении выделяется меньшее количество энергии.

Известно, что атмосферный воздух содержит приблизительно 78% азота, 20% кислорода и 0,03-0,09% углекислоты. Газообразный азот может быть использован только азотфиксирующими бактериями, углекислота – единственный источник углерода – утилизируется аутотрофными бактериями. Кислород используется при дыхании большинством видов бактерий.

«Непрямое окисление путем дегидрогенирования сопровождается переносом двух электронов, причем от субстрата отщепляется два протона (H^+). При ферментативном отщеплении водорода субстрата при помощи дегидрогеназ освобождаются два электрона (энергия) подобно образованию ацетальдегида из этилового спирта: $C_2H_5OH - 2H = C_2H_4O + 2H$ (акцептор) + $2e^-$ » (Н.М. Колычев, 1991).

Непрямое окисление подразделяют на аэробное дегидрогенирование и анаэробное дегидрогенирование.

«Аэробное дегидрогенирование происходит в присутствии кислорода и у таких микробов как, например, бациллы, акцептором водорода является кислород, в результате чего в зависимости от набора ферментов образуется вода или перекись водорода. Для этого у аэробных бактерий имеются цитохромоксидаза и система геминовых ферментов – цитохромов» (Н.М. Колычев, 1991).

«Анаэробное дегидрогенирование осуществляется в отсутствие молекулярного кислорода. Акцепторами водорода в данном случае являются другие неорганические элементы, например, соли азотной, серной кислот, углекислоты, которые превращаются при этом в более восстановленные соединения (аммиак, метан, сероводород). Свойство анаэробов переносить электроны на нитраты, сульфаты и карбонаты обеспечивает в достаточной степени полное окисление органического или неорганического вещества без использования молекулярного кислорода и обуславливает возможность получения ими большего количества энергии, чем при процессе брожения» (Н.М. Колычев, 1991).

По типу дыхания микробы подразделяют на четыре группы:

- 1) строгие, или облигатные аэробы;
- 2) облигатные анаэробы;
- 3) факультативные анаэробы;
- 4) микроаэрофилы.

Строгие аэробы не могут осуществлять свою жизнедеятельность в отсутствие молекулярного кислорода, так как они используют его в качестве акцептора электронов. К ним, например, относят бруцелл, микрококков, бордетелл, синегнойную палочку, микобактерий туберкулеза и других микроорганизмов. Аэробные бактерии в процессе дыхания окисляют различные органические вещества (углеводы, белки, жиры, спирты, органические кислоты и др.). Молекулы АТФ образуются аэробами при

окислительном фосфорилировании с участием оксидаз и дегидрогеназ с дальнейшим включением в цикл трикарбоновых кислот. В том случае, если конечным акцептором электронов является молекулярный кислород, образуется большое количество энергии (Д.К. Новиков, И.И. Генералов, Н.М. Данющенко, Н.В. Железняк и др., 2002).

Интенсивность процессов аэробного дыхания находится в зависимости от возраста культуры, температуры, качества питательных субстратов. Активно растущие культуры потребляют за 1 час 2500-5000 мм³ кислорода на 1 мг сухого вещества бактерий. Культуры же, лишенные многих питательных веществ, особенно азотистого питания, потребляют только лишь 10-150 мм³ кислорода. Молодой культурой вырабатывается тепловой энергии значительно больше, чем необходимо ей для обеспечения жизненно важных процессов. Часть энергии аккумулируется в АТФ, а некоторое количество ее выделяется во внешнюю среду. В качестве примера можно указать, что *E. coli* использует для процессов ассимиляции 31% выделяемой энергии, синегнойная палочка – 28%, протей – 20%, а сальмонелла, вызывающая брюшной тиф, – 12%. Некоторые виды микробов в результате развития их в навозе, мусоре, торфе выделяют такое количество тепла, которое может привести к самонагреванию куч указанных субстратов и даже самовозгоранию. Это учитывают при компостировании навоза и мусора, так как под действием высокой температуры вследствие жизнедеятельности термофильных бактерий погибают яйца мух и гельминтов и даже споры многих патогенных микробов.

Облигатные анаэробы – это микроорганизмы (кlostридии, бактериоиды и др.), способные жить и размножаться только при отсутствии кислорода воздуха. Эти микробы могут образовывать АТФ в результате превращения углеводов, белков, липидов путем субстратного фосфорилирования до пировиноградной кислоты, при этом образуется небольшое количество энергии. Если донорами и акцепторами водорода являются органические соединения, то такой процесс называется брожением. К анаэробным процессам относят спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое, муравьинокислое, маслянокислое, пропионовокислое брожение. Анаэробы ферментируют преимущественно безазотистые вещества. Непроходимой границы между аэробами и анаэробами проводить нельзя. Например, дрожжи могут анаэробный тип дыхания поменять на аэробный. Дело в том, что они вначале ферментируют сахар с образованием спирта и углекислоты, а при повышенной аэрации расщепляют его до воды и углекислоты. Наличие облигатных анаэробов объясняет большую приспособляемость микроорганизмов и полноту круговорота веществ в природе.

Ядовитое действие кислорода на анаэробы объясняют тем, что в присутствии его образуется перекись водорода. Ядовитым является не сам по себе кислород, а только перекись (H₂O₂). Анаэробы не способны продуцировать каталазу и поэтому они не могут нейтрализовать вредное действие H₂O₂ (К.Д. Пятаков, Ю.С. Кривошеин, 1980; Н.М. Данющенко, 2002).

Важным фактором, от которого зависят окислительно-восстановительные реакции у микробов, является окислительно-восстановительный потенциал питательной среды, выражающий количественную характеристику степени аэробности.

Этот потенциал минимален при насыщении среды водородом и максимален при насыщении ее кислородом. По предложению М. Кларка величину окислительно-восстановительного потенциала обозначают r_{H_2} – отрицательный логарифм парциального давления газообразного водорода. Эта величина характеризует насыщение среды кислородом или водородом (диапазон r_{H_2} от 0 до 42,6 характеризует все степени насыщения водного раствора водородом и кислородом). Аэробы растут при r_{H_2} 14-20, факультативные анаэробы - при 0-20 и выше, анаэробы – от 0 до 12.

По мнению В.А. Энгельгардта высокий потенциал инактивирует жизненно важные ферменты микробов. Он считает, что анаэробы при этом не способны к нормальному дыханию и питанию, к конструктивным процессам и погибают от голодания, а не отравления перекисью водорода. Установлено, что анаэробы способны приспосабливать среду к своим потребностям. Так, анаэробы, прежде чем начать размножаться, снижают окислительно-восстановительный потенциал с 20-22 до 1-5. Микробы обладают способностью ограждать себя от избытка кислорода восстановительным барьером. При старении культуры бактерий, при лизисе ее под воздействием фага и лизоцима окислительно-восстановительный потенциал снижается. Величина потенциала учитывается при получении питательных сред для микроорганизмов.

Факультативные анаэробы могут расти и размножаться как при доступе кислорода воздуха, так и при его отсутствии (большинство патогенных и сапрофитных микробов). Эти микроорганизмы образуют АТФ при окислительном и субстратном фосфорилировании, способны осуществлять анаэробное дыхание, которое называется нитратным. При этом нитрат как акцептор водорода восстанавливается до азота и аммиака. Среди факультативных анаэробов различают аэротолерантные бактерии, которые отличаются способностью расти при наличии молекулярного кислорода, но не использовать его (Н.М. Данющенко, 2002).

Микроаэрофилы – это микробы, развивающиеся при сниженном парциальном давлении кислорода. Например, лептоспиры, актиномицеты. Среди них различают микроаэрофильные аэробы (гонококки), которые лучше растут при низком содержании кислорода (около 5%) и микроаэрофильные анаэробы, растущие в анаэробных и микроаэробных условиях, не культивирующиеся в обычной воздушной среде или в углекислоте.

Н.М. Данющенко (2002) выделяет так называемые капнофильные микроорганизмы, способные расти при повышенных концентрациях углекислого газа от 3 до 5% (фузобактерии, бактериоиды, гемофильные бактерии и др.).

1.4. Рост и размножение бактерий

П.А. Буланов, О.И. Колешко (1969) утверждают: «К числу важнейших проявлений жизнедеятельности организмов относятся рост и размножение. По отношению к микроорганизмам рост определяется как увеличение массы цитоплазмы, размножение – как деление микробной клетки и увеличение численности особей».

По мнению К.Д. Пяткина и Ю.С. Кривошеина (1980): рост означает увеличение массы бактерий в результате синтеза клеточного материала.

Термин «рост» означает увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий в результате синтеза клеточного материала (например, белка, РНК, ДНК) – Н.А. Радчук, Г.В. Дунаев, Н.М. Колычев, Н.И. Смирнова, 1991.

А.А. Воробьев, А.С. Быков, М.Н. Бойченко и др.(1999) в книге «Микробиология и иммунология» (стр. 56) указывают: «Жизнедеятельность бактерий характеризуется ростом – формированием структурно-функциональных компонентов клетки и увеличением самой бактериальной клетки и размножением – самовоспроизведением, приводящим к увеличению количества бактериальных клеток в популяции».

А.А. Солонко, А.А. Гласкович, П.А. Красочко и др. (2002) придерживаются следующего мнения: «В микробиологии понятие рост используют в двух случаях: 1) рост клеток – процесс увеличения биомассы (размеров, объема, массы организма или его частей) в ходе индивидуального развития. Рост начинается после деления материнской клетки и состоит в последовательном увеличении количества РНК-белка-ДНК, всех параметров клетки и отдельных ее структур. Клетка быстро достигает стадии зрелости и приступает к размножению или переходит в стадию покоя; 2) рост популяции (культуры) – увеличение числа особей в локальной популяции, вызванное их размножением».

В монографиях, учебниках и практикумах по микробиологии понятие «рост» интерпретируется с некоторыми различиями, однако в целом можно заключить, что рост бактерий представляет собой увеличение размеров отдельной особи и упорядоченное воспроизведение во времени и пространстве всех ее химических компонентов и структур.

Попав в благоприятные условия, бактерии начинают расти. У них заметно изменяется форма и размеры. В фазе активного роста размеры микроорганизмов увеличиваются в два-три раза. Зачастую бактерии принимают уродливую форму, вид жгутов, кос, колбас, шаров. Объясняют это тем, что в среде создаются условия благоприятствующие росту, но тормозящие деление клеток. Активный рост клеток сопровождается исчезновением волютиновых зерен, интенсивного окрашивания содержимого и другими изменениями. При замедлении роста размеры клеток уменьшаются, они менее интенсивно окрашиваются анилиновыми красками. У многих видов микробов появляются зерна волютина, капельки жира, а у спорообразующих форм начинают формироваться споры. Если рост замедляется, появляются инволюционные клетки (жгутиковидные,

веретенообразные, шарообразные и т.д.), что свидетельствует о патологии бактерий.

Скорость роста зависит от качества питательной среды, физических условий, состояния бактерий и их физиологических особенностей. Рост микроорганизмов изучают последовательными измерениями бактериальной клетки через определенные промежутки времени. Рост клеток в культуре определяют изменением некоторого количества их с последующим выведением среднего значения величины с поправкой, полученной при обработке данных статистическим методом.

При наличии благоприятных условий бактериальные клетки начинают размножаться. Большинство авторов (В.Д. Тимаков, В.С. Левашов, 1983; Н.М. Колычев, 1991; А.А. Воробьев, А.С. Быков, А.М. Рыбакова, 1998; А.А. Солонко, А.А. Гласкович, П.А. Красочко и др., 2002) под понятием «размножение» понимают процесс воспроизведения себе подобных особей, обеспечивающий продолжение существования вида.

Бактерии размножаются простым поперечным делением (вегетативное размножение), реже почкованием. Актиномицеты, являясь ветвящимися бактериями, могут размножаться путем фрагментации нитевидных клеток. Микроскопические грибы преимущественно размножаются спорами. Спорами могут размножаться и актиномицеты. У бактерий описан также половой путь размножения. При поперечном делении, которое может происходить в различных плоскостях, формируются многообразные сочетания клеток (гроздь, цепочки, тюки и др.).

Грамположительные бактерии делятся путем вставания синтезирующихся перегородок деления внутрь клетки, а грамотрицательные путем перетяжки, в результате чего образуются гантелевидные фигуры, из которых возникают две клетки.

Грибы, размножающиеся половым и бесполом путем, относятся к совершенным, а грибы, у которых отсутствует или еще не описан половой путь размножения, называются несовершенными. Бесполое размножение у грибов может осуществляться путем равномерного септирования и расчленения гиф, но чаще всего с помощью спор – эндогенных, созревающих внутри круглой структуры (спорангия) и экзогенных – конидий, формирующихся на кончиках плодоносящих гиф.

Электронная микроскопия позволила выявить у бактерий половое размножение. Были получены данные о наличии у микробов, в частности у *E.coli*, особого типа скрещивания, напоминающего слияние ядерного вещества – конъюгацию клеток. Установлено, что так называемые «мужские» клетки содержат фактор фертильности (плодовитости) F , который составляет часть генетического материала клетки (ген). «Мужские» клетки служат донорами этого фактора, который в процессе конъюгации проникает в «женские» клетки, являющиеся реципиентами фактора плодовитости. Мужские клетки обозначают F^+ , женские – F^- . Половое размножение описано у *E.coli*, бактерий родов *Achromobacter*, *Serratia*, актиномицетов. Путем полового размножения можно получать гибриды близко-

родственных видов, например, семейства *Enterobacteriaceae*. Электронная микроскопия позволила установить, что «мужские» и «женские» клетки соединяются между собой цитоплазматическими мостиками. Если через некоторое время их разъединить, то в процессе раздельного культивирования этих клеток можно обнаружить признаки как «мужских», так и «женских» особей. После конъюгации эти бактерии делятся обычным путем, передавая наследственные признаки потомству. Ранее считали, что из одной микробной клетки образуются две равноценные дочерние клетки. Сейчас доказано, что материнская клетка может повторять процесс деления несколько раз, после чего она погибает.

Делению клеток предшествует репликация (удвоение) ДНК. Двунитевая цепь ДНК удваивается, а затем достраивается комплементарной нитью. Репликация ДНК осуществляется от начальной точки *ori* (от англ. *origin* – начало). Хромосома бактериальной клетки связана в области *ori* с цитоплазматической мембраной. Репликация ДНК катализируется ДНК-полимеразами.

Различают три типа деления клеток бактерий:

1. Клеточное деление опережает разъединение дочерних, что приводит к образованию «многоклеточных» скоплений палочек, кокков.

2. Синхронное клеточное деление и расхождение клеток, что наблюдается у одноклеточных организмов.

3. Деление нуклеоида опережает клеточное деление, что обуславливает возникновение многоклеточных бактерий.

Разделение бактерий происходит следующими способами:

1. Разламывающее разделение состоит в неоднократном переламывании двух клеток в месте сочленения, разрыве цитоплазматического мостика и отламывании их друг от друга, в результате образуется цепочка бактерий (например, сибиреязвенные бациллы).

2. Скользящее разделение – это такое разъединение, когда одна из клеток свободным концом описывает дугу круга, центром которого является точка ее контакта с другой клеткой, образуя букву V (листерии, коринебактерии).

Скорость размножения микробов может быть различной, что зависит от вида бактерий, возраста культуры, качества питательной среды, температуры культивирования, аэрации растущей культуры и многих других факторов.

При благоприятных условиях культивирования деление, например, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus faecalis* составляет 15 минут, а скорость размножения *E.coli* – 20-30 минут. Высокая интенсивность размножения имеет для бактерий большое биологическое значение, так как она обеспечивает сохранение микроорганизмов в естественной среде обитания. При неблагоприятных условиях существования микробы погибают массами, но достаточно сохраниться нескольким клеткам, которые при наступлении подходящих условий для их размножения дадут начало популяции, состоящей из особей, исчисляемых астрономическими цифрами.

Бактерии, засеянные в определенный неизменяющийся объем жидкой питательной среды (пробирку, колбу, реактор), размножаясь, потребляют питательные вещества, что приводит к истощению питательной среды, накоплению в ней продуктов метаболизма и прекращению роста микроорганизмов. Культивирование бактерий в несменяемой среде определенного объема называют периодическим, а культуру – периодической. В том случае, если культивирование поддерживают путем непрерывной подачи свежей питательной среды и оттока такого же объема культуральной жидкости, культивирование называют непрерывным, а микробную культуру – непрерывной.

Рост периодической культуры подразделяют на несколько фаз или периодов.

Многие авторы различают восемь фаз роста бактерий, сменяющих друг друга в определенной последовательности (И.Л. Работанова, 1966; П.А. Буланов, О.И. Колешко, 1969; К.Д. Пяткин, Ю.С. Кривошеин, 1980; В.Д. Тимаков, В.С. Левашев, Л.Б. Борисов, 1983; Н.А. Радчук, Г.В. Дунаев, Н.М. Колычев, Н.И. Смирнова, 1991; Д.К. Новиков, И.И. Генералов, Н.М. Данющенко и др., 2002).

А.А. Солонко, А.А. Гласкович, П.А. Красочко, А.П. Лысенко и др. (2002) различают шесть фаз роста периодической культуры.

А.В. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.И. Рыбакова (1998), А.А. Воробьев, А.С. Быков, М.Н. Бойченко, С.А. Дройвин, Ю.В. Несвижский (1999) подразделяют рост бактерий периодической культуры на четыре фазы.

Мы приводим подразделение роста микробов периодической культуры на все вышеуказанные фазы.

Подразделение роста бактерий на восемь фаз:

1. Исходная стационарная фаза (1-2 часа) – время от момента посева до начала роста. В этой фазе число живых бактерий не увеличивается, клетки не делятся, но наблюдается изменчивость их формы.

2. Лаг-фаза или фаза задержки размножения длится около 2-5 часов. Эта фаза характеризуется началом размножения бактерий, интенсифицируется метаболизм, увеличивается количество белка, РНК, идет фенотипическая и генотипическая адаптация к среде, синтезируются индуцибельные ферменты.

3. Логарифмическая фаза размножения характеризуется максимальной скоростью размножения бактерий, число их в культуре возрастает в геометрической прогрессии. При оптимальных условиях бактерии делятся через каждые 20-40 минут. Продолжительность фазы - 5-6 часов.

4. Фаза отрицательного ускорения начинается замедлением размножения бактерий из-за истощения питательной среды, т.е. исчезновения веществ, необходимых для размножающихся микробов. Продолжительность этой фазы - около 2 часов.

5. Стационарная фаза максимума – это фаза, в которой количество погибающих бактерий равно количеству вновь появившихся. Общая кон-

центрация микробных клеток в единице объема достигает максимума. Ее продолжительность – 2 часа.

6. Фаза ускорения гибели – в этой фазе отмирание микробов превышает скорость их размножения. Обнаруживаются морфологические изменения клеток, появляются их инволюционные формы. Длится около 2 часов.

7. Фаза ускорения гибели переходит в фазу логарифмической гибели, в которой скорость отмирания бактерий достигает максимума. Длительность фазы - около 5 часов.

8. Фаза уменьшения скорости отмирания характеризуется тем, что оставшиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

Последовательная смена фаз, их характер и продолжительность зависят от вида культивируемых микробов, а также разнообразных факторов питательной среды и условий культивирования.

Подразделение роста бактерий на шесть фаз:

1. Начальная стационарная, или лаг-фаза.
2. Фаза положительного ускорения, в которой начинается деление бактерий.

3. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза, отличающаяся максимальной скоростью размножения клеток и увеличением их количества в геометрической прогрессии.

4. Фаза отрицательного ускорения, характеризующаяся замедлением темпа размножения.

5. Стационарная фаза максимума, в которой количество жизнеспособных особей в единице объема среды для каждого вида бактерий достигает постоянного максимального уровня.

6. Отмирание культуры, заканчивающееся переходом живой популяции в состояние покоя.

Подразделение роста бактерий на четыре фазы:

1. Лаг-фаза. 2. Фаза логарифмического роста. 3. Фаза стационарного роста. 4. Фаза гибели бактерий.

Лаг-фаза (от англ. lag – запаздывание) – период между посевом бактерий и началом их размножения. В этой фазе в клетках повышается количество нуклеиновых кислот, белка и других компонентов, бактерии увеличиваются в размерах и готовятся к делению. Продолжительность этой фазы составляет 4-5 часов.

Фаза логарифмического (экспоненциального) роста – это период наиболее интенсивного роста и деления бактерий. Бактерии делятся 20-40 минут (время генерации – интервал между делениями клетки). Продолжительность фазы – 5-6 часов. В этой фазе бактерии наиболее ранимы, что объясняется высокой чувствительностью интенсивно растущих клеток к ингибиторам синтеза белка, нуклеиновых кислот и других соединений.

Фаза стационарного роста характеризуется тем, что количество вновь нарождающихся клеток равно количеству отмирающих бактерий.

Продолжительность этой фазы - 3-4 часа.

Фаза гибели характеризуется отмиранием клеток в связи с истощением питательных веществ, в среде и накоплением в ней продуктов метаболизма бактерий. Продолжительность этой фазы исчисляется десятками часов и даже несколькими неделями.

При развитии микробной популяции выделяют два основных процесса – размножение и отмирание клеток. Поэтому популяцию бактерий в определенный момент времени можно количественно охарактеризовать двумя параметрами: концентрацией живых клеток и величиной, указывающей на общее количество как живых, так и погибших микробов.

Количество живых клеток в популяции определяют путем высева разведенных проб растущей культуры на плотную питательную среду, на поверхности которой каждая клетка формирует колонию. Подсчет числа колоний характеризует концентрацию жизнеспособных клеток в единице объема питательной среды.

Общее число бактерий определяют по оптической плотности культуральной жидкости с помощью фотоэлектроколориметров или спектрофотометров, используют микроскопический метод подсчета клеток в счетной камере и другие методы.

Рост микробов в полужидких средах, например, в мясо-пептонном полужидком агаре (МППА), происходит по уколу в виде беловатого стержня, если микробы не обладают подвижностью. При высеве подвижных микроорганизмов они в процессе роста и размножения вызывают помутнение всего объема полужидкой среды. Посев микробов в МППА, в мясо-пептонную желатину (МПЖ) делают уколом строго по центру в глубь среды или же в непосредственной близости к стенке пробирки.

Рост микробов на плотных питательных средах, в частности на мясо-пептонном агаре (МПА), проявляется формированием колоний. Колонии – это скопления микробов, образовавшиеся в результате роста и размножения одной бактериальной клетки. Колонии характеризуются большим разнообразием. Они могут быть различного цвета и размеров, иметь различную поверхность, профиль, структуру и т.д., что учитывают при идентификации микроорганизмов.

1.5. Ферменты микроорганизмов

Наука о ферментах – энзимология – возникла сравнительно недавно – в первой половине 19 века. Особенно бурное развитие она получила в последние десятилетия. В настоящее время – это обширная область знания. На сегодняшний день известно более 2000 ферментов, описаны их основные свойства, дана физико-химическая характеристика, разработаны методы количественного определения ферментов и их очистки. Первые работы по получению ферментов в чистом виде были проведены Р. Вильштеттером (1922-1928 г.г.). В 1926 г. американский биохимик Саленер получил фермент уреазу в кристаллическом виде.

Жизнь зависит от сложной совокупности химических реакций,

осуществляемых специфическими ферментами, любое изменение их деятельности может повлечь за собой серьезные последствия для живого организма. В отличие от химических катализаторов, которые ускоряют многие химические реакции и действуют в широком диапазоне, ферменты являются биологическими катализаторами. По словам Павлова, «биокатализаторы есть возбудители жизни» (П.А. Буланов, О.И. Колешко, 1969).

Ферменты – это биологические катализаторы, глобулярные белки, молекулярная масса которых колеблется от 15кД до нескольких тысяч, участвующие в процессах анаболизма и катаболизма.

Микробная клетка может содержать большое количество ферментов. Например, у аспергилла обнаружено до 50 ферментов. Благодаря этому микроорганизмы в состоянии осуществлять одновременно ряд различных реакций в среде, где они находятся.

Основные свойства ферментов следующие:

1. Не входят в состав конечных продуктов реакции и не расщепляются в ее циклическом процессе.
2. Ускоряют только те реакции, которые, подчиняясь законам термодинамики, могут протекать и без их участия.
3. Все ферменты синтезируются только живыми клетками.
4. Основной составной частью фермента является белок.
5. Ферменты отличаются высокоспецифическим действием, каждый из них ускоряет или катализирует только одну или группу сходных между собой реакций.
6. Ферменты – высокомолекулярные коллоиды.

От химических катализаторов ферменты отличаются по структуре и характеру действия:

1. Являются белками.
2. Отличаются узким спектром действия на субстраты.
3. При производстве различных веществ обеспечивают почти 100%-ный выход чистых продуктов;
4. В организме регулируют и координируют процессы образования жизненно необходимых веществ, участвуя в поддержании гомеостаза.
5. Скорость протекания ферментативных реакций в организмах на несколько порядков выше, чем реакций *in vitro* с участием химических катализаторов (П.А. Буланов, О.И. Колешко, 1969; К.Д. Пяткин, Ю.С. Кривошеин, 1980; Н.А. Радчук, Г.В. Дунаев и др., 1991; Д.К. Новиков, И.И. Генералов, Н.М. Данющенко и др., 2002; С.А. Павлович, 2005).

Ферменты классифицируют на:

- экзоферменты, катализирующие процессы расщепления сложных веществ вне клетки;
- эндоферменты – катализируют метаболизм, протекающий внутри клетки.

Экзоферменты выделяются в субстрат при жизни микробной клет-

ки, растворимы в питательной среде, проходят через бактериальные фильтры. Эти ферменты расщепляют сложные высокомолекулярные вещества (белки, крахмал, клетчатку и др.) и подготавливают их к усвоению микробной клеткой, т.е. они обеспечивают процесс питания.

Эндоферменты прочно связаны с клеткой бактерий и действуют только внутриклеточно. Они осуществляют разложение питательных веществ, поступающих в клетку, и включение их в составные части бактерий.

По объекту действия ферменты подразделяют на:

- 1) ферменты белкового синтеза - связаны с рибосомами;
- 2) ферменты энергетического обмена и транспорта питательных веществ, располагаются в ЦПМ и мезосомах;
- 3) ферменты метаболизма белка;
- 4) ферменты, расщепляющие углеводы.

Все известные в настоящее время ферменты разделяют на 6 классов:

- 1) оксидоредуктазы; 2) гидролазы; 3) трансферазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы.

Оксидоредуктазы – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, им принадлежит ведущая роль в процессах биологического получения энергии (дегидрогеназа, каталаза и др.)

Гидролазы – катализируют реакции расщепления и синтеза сложных соединений, таких как белки, жиры, углеводы с участием молекул воды (эстеразы, фосфатазы, глюкозидазы).

Трансферазы – переносят отдельные радикалы и атомы от одних соединений к другим (ацетилтрансфераза, фосфотрансфераза, аминокотрансфераза и др.).

Лиазы – разрывают связи между атомами углерода негидролитическим путем (карбоксилазы).

Изомеразы – ферменты, превращающие органические соединения в их изомеры (фосфогексоизомераза).

Лигаза, или синтетазы – ускоряют синтез сложных соединений из более простых (аспарагинсинтетаза, глутаминсинтетаза и др.).

Кроме этого, различают конститутивные и индуцибельные (индуктивно-адаптивные) ферменты.

К конститутивным относят ферменты, которые синтезируются клеткой непрерывно, независимо от наличия в питательной среде соответствующего субстрата (лиазы, оксидазы).

Индукцибельные ферменты синтезируются бактериальной клеткой только при наличии в среде субстрата данного фермента. Например, β-галактозидаза кишечной палочки на среде с глюкозой практически не образуется, но ее синтез резко возрастает при выращивании *E.coli* на среде с лактозой.

У патогенных микробов имеются ферменты агрессии, которые способствуют проникновению, распространению и паразитированию микро-

организмов в макроорганизме (гиалуронидаза, коллагеназа, нейраминидаза, коагулаза, ДНК-аза).

Переоценить значение ферментов в жизнедеятельности микробов невозможно. Они катализируют процессы питания, дыхания, роста и размножения. Все процессы обмена и базирующиеся на них вирулентность, патогенность, антигенная структура зависят от набора и локализации ферментов. Каждый вид бактерий обладает определенным набором ферментов, что обусловлено генотипом. Скорость реакций, катализируемых ферментами, различна и зависит от количества и активности ферментов, концентрации субстрата, значения рН, температуры, присутствия в среде активаторов и ингибиторов. Активаторы – соединения, содержащие сульфгидрильную группу - SH, например, аминокислота цистин, интенсифицируют деятельность ферментов. Ингибиторы – соли тяжелых металлов (свинца, ртути), трихлоруксусная кислота, танин. Они осаждают любой фермент и дают с белками нерастворимые осадки. Ферменты у непатогенных микробов обеспечивают их высокую биохимическую активность. У патогенных бактерий биохимическая активность ниже. Биохимические свойства микробов учитывают при определении вида возбудителя, что имеет практическое значение для постановки диагноза на инфекционную болезнь.

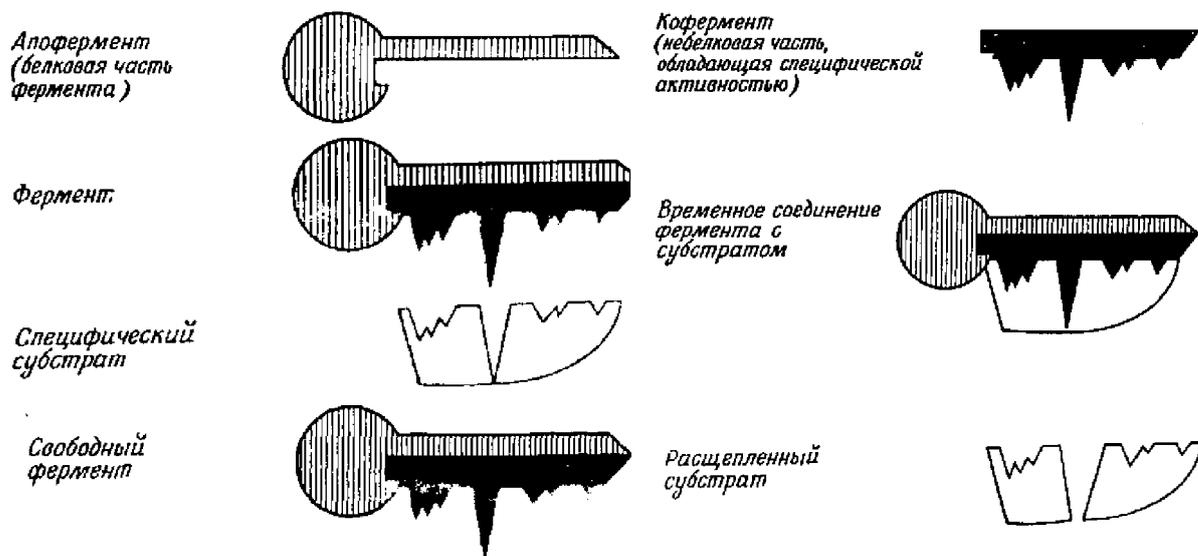


Рисунок 1-Специфичность действия фермента

Ферменты микробов используют в генной инженерии. С их помощью получают уксусную, молочную, лимонную и другие кислоты. Кроме этого, ферменты применяют в приготовлении молочных продуктов (сыр, ацидофилин, кумыс, кефир и др.), в виноделии, пивоварении, хлебопечении, силосовании кормов для животных.

Общий механизм биологического действия ферментов, согласно С.А. Павловичу (2005), заключается в следующем. Каталитическую активность любого фермента определяет его активный центр. Располагается активный центр в так называемом «кармане», углублении образован-

ном третичной структурой молекулы фермента. В каталитическом действии ферментов выделяют три стадии. Первая стадия – присоединение молекулы субстрата (S) к ферменту (E), вторая – превращение субстрата, третья – отделение конечных продуктов реакции (P) от катализатора, что можно представить в виде формулы: $E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow E + P$.

Образование фермент–субстратного комплекса ES становится возможным благодаря взаимному сродству. При этом молекулы фермента и субстрата не только сближаются, но и определенным образом ориентируются относительно друг друга. В результате связывания субстрата с ферментом образуется комплекс, который через ряд промежуточных стадий дает продукт реакции (P). Быстрому протеканию этой реакции способствует то, что взаимодействие фермента с субстратом вызывает в нем высокое напряжение внутримолекулярных связей, легко разрывающихся при относительно небольшом повышении внутренней энергии молекул.

Основным свойством ферментов является специфичность их действия, что подтверждается нижеприведенной схемой.

1.6. Влияние на микроорганизмы физико-химических факторов

Роль микроорганизмов в возникновении и эволюции биосферы исключительно велика. Они составляют более одной трети ее живого вещества, и почти нет природных процессов, в которых микроорганизмы не принимали бы активного участия.

В естественных условиях микроорганизмы очень редко находятся в оптимальных условиях обитания. На них неизбежно воздействуют разные физико-химические факторы и часто в экстремально высоких или низких дозах и концентрациях.

В настоящей книге мы представляем сводку данных о влиянии различных физико-химических воздействий на микроорганизмы, так как в многочисленных учебниках и практикумах по ветеринарной и медицинской микробиологии авторы ограничиваются лишь описанием влияния на микробы температурного фактора, кислорода, концентрации водородных ионов, качества питательной среды, имея в виду при этом лабораторное или же промышленное культивирование в основном патогенных микробов, возбудителей различных инфекционных болезней животных и человека. Однако, даже в случае культивирования микробов в лабораторных и производственных условиях на них могут оказывать воздействие различные, и в первую очередь, физические факторы.

Физической наукой доказано, что электромагнитные волны бывают космического и земного происхождения. Периодические изменения электромагнитного поля, создаваемого колеблющимися электрическими зарядами, являются электромагнитными волнами. После мощных вспышек на Солнце отмечают всплески рентгеновского излучения и магнитные бури в земной атмосфере, что сказывается на всех земных объектах и

субъектах. Кроме мощных вспышек и связанных с ними излучений, наблюдают менее мощную ритмичную активность Солнца и обусловленные ею пульсирующие солнечные излучения. Установлено, что эти излучения влияют на скорость роста дрожжей *Candida utilis*. Отмечено, что со 160-минутными изменениями солнечной активности совпадают изменения в скорости роста дрожжей, т.е. ритмичное колебание электромагнитных волн приводит к ритмичным колебаниям скорости роста микроорганизмов.

По данным И.М. Пархоменко, Н.А. Романова, Т.М. Сидякина и др. (1989), воздействие космического излучения на вегетативные клетки и споры *Bacillus brevis* G-B вело к стимуляции колониеобразования, роста биомассы, синтеза антибиотика, повышения концентрации АТФ в клетках. Опыты на биоспутнике «Космос 1887» показали, что стимуляция жизнедеятельности *Bacillus brevis* G-B связана с действием космического излучения, т.е. подтвердили данные вышеуказанных авторов.

Коротковолновые электромагнитные волны часто называются ионизирующими излучениями (альфа-, бета-, гамма-, рентгеновские лучи). Ионизирующие излучения в больших дозах могут вызывать гибель микробных клеток и могут вести к образованию мутантов путем прямого воздействия на ДНК или же опосредованно – через свободные радикалы.

Ультрафиолетовые волны с длиной волны 200-290 нм называют дальними, 290-300 нм – средними, а с длиной волны 320-400 нм – ближними. Самыми опасными для живых клеток являются дальние и средние ультрафиолетовые волны. Однако эти волны космического происхождения и не достигают поверхности Земли. В земных условиях дальние и средние ультрафиолетовые волны могут возникать в результате научно-производственной деятельности людей с помощью специальной аппаратуры и отрицательно воздействовать на живые организмы, в том числе и микробы.

Ближние ультрафиолетовые волны имеют естественное космическое происхождение, достигают поверхности Земли и оказывают на микроорганизмы в зависимости от доз облучения различные воздействия. Установлено, что большие дозы ведут к удлинению лаг-фазы засеянной культуры, снижению скорости размножения бактерий, могут вызывать мутагенный и летальный эффекты. С помощью ближних ультрафиолетовых волн можно получить ценные мутанты. Например, путем облучения этими волнами получен ценный для хлебопекарной промышленности мутант *Saccharomyces cerevisiae*.

Солнечная радиация представляет собой сложный комплекс излучений, содержащий электромагнитные волны различной длины, в том числе видимый (400-740 нм) и инфракрасный свет (0,76-500 мк).

Для фототрофных микроорганизмов свет есть условие существования. К ним относят, например, пурпурные бактерии, зеленые бактерии, гелиобактерии и другие. На нефотосинтезирующие микроорганизмы видимый свет может оказывать стимулирующее и, наоборот, угнетающее

действие.

Стимулирующее действие света при определенной длительности и интенсивности освещения на рост бактерий *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium butyricum*, дрожжей *Saccharomyces vini* проявлялось наиболее четко при обработке светом посевного материала или же растущей культуры, но не на ее первых стадиях роста. Было установлено сокращение лаг-фазы, ускорение синтеза РНК, ДНК, белка, скорости дыхания.

От губительного действия световой энергии в природных условиях микроорганизмы защищаются путем синтеза пигментов. Это ярко выражено у многих психрофильных штаммов, содержащих меланин в клеточной стенке, например черный пигмент меланиновой природы у холодолюбивых дрожжей. Однако, у них черная пигментация может служить с одной стороны защитой от сильнодействующих облучений и света, а с другой – удерживать тепло.

В.Н. Петров, У.М. Асланян, Ф.Ш. Исангапин (1989) установили, что защитное действие темного пигмента присуще для большинства бактерий. Вегетативные клетки, споры и токсины пигментированных штаммов в 4 раза устойчивее к инсоляции, чем бесцветные штаммы.

Область инфракрасного света охватывает длины волн от 780 нм до 1000 мкм. Действие инфракрасного света на микроорганизмы изучено плохо.

Радиоволны сверх высокой частоты вызывают тепловой эффект – разогрев может достигать до 96°C. В этой связи микроволновый нагрев применяют для стерилизации пищевых продуктов. Тем не менее, были поставлены опыты, исключаящие тепловой эффект, т.е. воздействие высокой температуры на микробные клетки. В результате экспериментов установлено, что клетки *E. coli* отрицательно реагируют на радиоволны – уменьшается их концентрация в культуре, кроме этого, регистрируют явление отрицательного радиотаксиса.

Исследования по действию ультразвука на микроорганизмы начались с 1928 г. и довольно активно ведутся и в настоящее время. Было установлено разрушающее воздействие ультразвука на микробы. Поэтому ультразвук начали использовать для дезинтеграции грамположительных и грамотрицательных аэробных и анаэробных, патогенных и сапрофитных микроорганизмов. В дальнейшем было выявлено стимулирующее влияние ультразвука на микробы, но при условии кратковременного воздействия и подбора соответствующей его мощности. Например, кратковременная обработка ультразвуком азотобактера при интенсивности 5-6 Вт/см² и частоте 765 к Гц вела к увеличению биомассы бактерий в два раза по сравнению с контролем (О.И. Колешко, Б.Я. Эльберт, М.Я. Резников, 1968).

Сила земного тяготения оказывает определенное воздействие на микроорганизмы, несмотря на их ничтожные размеры. Об этом свидетельствует факт постепенного оседания клеток бактерий, взвешенных в жидкой среде, хотя их плотность близка к плотности воды, а также на-

блюдаемое повышение концентрации клеток в нижней части объема питательной среды по сравнению с верхней. И все же, для прокариот геотаксис не установлен, т.е. реакция на гравитационное поле Земли – способность стремиться к определенному пространственному расположению в среде обитания. Однозначно утверждать об отсутствии влияния силы земного тяготения на микробы пока еще не возможно.

Все живое и неживое на Земле находится в области ее магнитного поля. Изучать влияние магнитных полей на микроорганизмы невозможно, т.к. нельзя поставить контроль, на который действуют так же магнитные поля Земли. В работах отдельных авторов изучалось воздействие на микроорганизмы магнитного поля искусственного происхождения. Так, зарегистрировано влияние постоянного магнитного поля на прорастание спор актиномицетов - магнитное поле низкой напряженности ускоряло их прорастание, а поле высокой напряженности вело к угнетению роста бактерий. Некоторым видам бактерий свойственен магнитотаксис – расположение в водной среде в соответствии с направлением силовых линий магнитного поля Земли.

Поверхность клетки микробов, как известно, имеет электрический заряд, чаще всего отрицательный, вследствие чего клетка обладает электрофоретической подвижностью. В случае попадания клеточной суспензии в постоянное электрическое поле, отрицательно заряженные клетки, независимо от наличия у них органов движения, перемещаются к положительному полюсу – аноду. Это свойственно эукариотам, прокариотам, белковым молекулам. Электрофоретическая подвижность послужила основой для разработки ряда методик и аппаратуры для разделения клеток и белков. Воздействие сильного электрического поля на культуру микробов ведет к электрокоагуляции.

Изучение влияния биологического поля проводили Л.И. Караченцева и Ю.Н. Левчук (1989), используя культуры зеленой водоросли *Dunallella viridis* и бактерии *E. coli*. Источником воздействия служила ладонь руки человека. Контролем служили мертвые культуры тех же видов. Авторы установили, что под влиянием биополя человеческой ладони клетки водоросли и бактерии покидают зону воздействия. Тело человека является источником электромагнитного и инфракрасного излучений. Поэтому предположение авторов о вероятном радиоконтакте биологических объектов и о наличии отрицательной радиорецепции миллиметровых волн у клеток микроорганизмов является довольно убедительным.

Световые и звуковые воздействия на микроорганизмы сопровождаются в большинстве случаев и тепловым эффектом. Микроорганизмам свойственен термотаксис. Тепловой фактор среды обитания является одним из решающих для роста и развития микроорганизмов. В соответствующих экологических нишах приспособились к существованию термофилы, мезофилы, психрофилы. В природных условиях может происходить ингибирование роста популяции избытком тепловой энергии или торможение роста и развития недостатком тепла. Замерзшие в естествен-

ных условиях микроорганизмы могут пребывать в таком состоянии длительное время – многие тысячелетия, не теряя своей жизнеспособности (С.С. Абызов, Н.Е. Бобин, Б.Б. Кудряшов, 1987). Это явление представляет большой научный и практический интерес в плане возможности длительного хранения микроорганизмов без утраты их биологических свойств.

Глубоководные организмы, как известно, выдерживают высокое давление. Микроорганизмы, обитающие на дне океанов и морей, выдерживают очень высокое давление. Практически точно не установлена предельно высокая величина давления, летального для бродильных бактерий. Баротолерантные и барофильные микроорганизмы, как правило, психрофильны. Известно, что экстремально высокое давление может ингибировать в большей степени размножение клеток, чем энергетические процессы.

В условиях естественного обитания микробные клетки подвержены высушиванию, но после высыхания и приостановки их жизни, попав в условия достаточной влажности, они восстанавливают свою жизнедеятельность и снова выполняют свои функции в природе, стабилизируя сохранность вида и его взаимоотношения с окружающей средой. Учитывая эту природную приспособленность, микроорганизмы лиофилизуют с целью сохранения их свойств при длительном хранении. Высушивание клеток микроорганизмов может повредить их генетический аппарат, что в ряде случаев вызывает мутационные изменения. Это необходимо иметь в виду при использовании штаммов микроорганизмов, хранящихся в высушенном состоянии.

Осмотическое давление имеет большое значение для осуществления нормальной жизнедеятельности микробной клетки. Если внешняя среда не содержит солей, то вследствие большей концентрации их внутри клетки, вода поступает в клетку и бактерия разрывается. Это явление носит название гипотонического стресса, или плазмолиза. Напротив, при высокой концентрации солей вне клетки, вода покидает ее, клетка уменьшается в размерах, цитоплазма сжимается, т.е. происходит гипертонический стресс, или плазмолиз.

Значение окислительно-восстановительного потенциала и рН используют обычно для характеристики окислительных и других способностей среды, клетки и отдельных химических растворов. Окислительно-восстановительный потенциал служит мерой способности отдавать или принимать электроны. Этот потенциал отсчитывается относительно потенциала молекулярного водорода. Значение величины окислительно-восстановительного потенциала и величины рН учитывают при лабораторном и промышленном культивировании, корректируя величину упомянутых показателей в процессе роста бактерий в определенных границах.

Молекулярный кислород для большинства живых существ является «эликсиром» жизни. Кислород в повышенных концентрациях может тор-

мозить рост даже аэробных микроорганизмов. Токсичен не сам по себе кислород, а токсичны промежуточные продукты восстановления кислорода: супероксид, перекись водорода. Микроорганизмы противостоят губительному воздействию перекиси водорода с помощью пероксидаз и каталаз. Микробные клетки способны продуцировать антиоксидатные ферменты, которые могут играть значительную роль в защите бактерий не только от высоких концентраций кислорода, но и озона. Для ингибирования перекисного окисления используют антиоксиданты. Например, для защиты от чрезмерного окисления при усиленной аэрации и для ускорения роста дрожжей рода *Candida* к среде добавляли антиоксиданты, что позволило повысить накопление клеток на 20%.

Люди, животные, птицы, насекомые, растения и микроорганизмы выделяют в воздушную среду многочисленные летучие вещества, которые оказывают определенное воздействие на микро- и макроорганизмы. Установлены следующие летучие метаболиты живых существ: альдегиды, спирты, жирные кислоты, карбонильные соединения, азотсодержащие основания и другие.

Эти метаболиты могут стимулировать рост и размножение различных, особенно, гетеротрофных микроорганизмов. Поэтому в помещениях, загрязненных различного рода органическими веществами жизнедеятельность гетеротрофных популяций микробов может поддерживаться неограниченное время.

Из приведенного выше материала следует, что при воздействии на микроорганизмы физико-химических факторов они проявляют хемотаксис, осмотаксис, рН-таксис, радиотаксис, активную реакцию на свет, температуру, давление и другие внешние факторы при их воздействии в физиологически допустимых пределах. Микроорганизмы реагируют на внешние раздражители по принципу «стимул-ответ» или «отрицательное воздействие – отрицательный ответ».

Влияние физико-химических факторов на микроорганизмы и ответная реакция их на эти факторы – пока еще сложная нерешенная проблема, требующая пристального внимания ученых и проведения целенаправленных исследований.

Глава 2. Питательные среды

Приготовление питательных сред – один из наиболее ответственных и трудных участков бактериологической лаборатории. В настоящее время питательные среды в лабораториях ветеринарного и медицинского назначения готовят значительно реже, т.к. в необходимых объемах их выпускает фармацевтическая промышленность, фирмы, научно-производственные объединения, акционерные общества. Производители предлагают потребителям в основном сухие среды в виде мелкодисперсных порошков, кристаллов, гранул, шариков, таблеток, паст. Эти среды имеют продолжительный срок годности при строгом соблюдении режима хранения. Сухие среды хорошо растворяются в воде без помутнения и образования осадка. Необходимо помнить, что сухие среды исключительно гигроскопичны и поэтому их хранят в герметически закрытой таре. Увлажнение сред приводит к снижению их качества и выбраковке. Преимуществом сухих сред является простота изготовления из них жидких, полужидких и плотных питательных сред. Однако, необходимо учитывать, что при длительной работе с ними у работников могут возникать аллергии.

Сухие питательные среды в промышленном масштабе в РБ не производят. В широком ассортименте эти среды выпускают зарубежные фирмы: «Дифко», BBL (США), «Оксид» (Великобритания), «Weston Dickinsoo» (ФРГ), «Иммуна» (Чехословакия) и другие. В РФ до 50% потребностей рынка обеспечивают основные производители питательных сред, т.е. ФБУН ГНЦ Роспотребнадзора и НПО «Питательные среды» (Махачкала). Крупным поставщиком питательных сред является компания Himedia (Индия), которая выпускает среды для микроорганизмов со сложными питательными потребностями, готовые к применению в чашках Петри, транспортные среды, хромогенные, дифференциально-диагностические и другие.

Считают, что лидером в производстве и экспертизе диагностических и культуральных сред, оборудования и расходных материалов для лабораторий является Himedia Laboratoris Pvt Limited (Индия). Эта компания имеет Международный сертификат качества, ассортимент ее продукции весьма разнообразен: сухие и готовые к употреблению питательные среды, различные компоненты (бактериологический агар, пептоны, желчь и соли желчных кислот, дрожжевой, мясной и другие экстракты), среды для культур клеток, диски с антибиотиками, пластмассовая посуда и ее разные типы, системы для выделения гемокультур, металлические бактериологические петли и многое другое.

Компания предлагает потребителям хромогенные питательные среды, которые в мировой бактериологической практике находят все более широкое применение. Слово «хромоген» является комбинацией двух греческих слов: *chroma (chromatos)* – цвет и *genes* – порождающий. Принцип действия хромогенных питательных сред заключается в образовании ок-

рашенных веществ (индикаторов) в результате взаимодействия высоко-специфичных ферментов бактерий с компонентами среды. Хромогенные среды в зависимости от консистенции подразделяются на жидкие и плотные.

Примером среды, основанной на способности микробов ферментировать неокрашенный субстрат в окрашенный, является хромогенный бульон для энтерококков. В бульоне имеется субстрат (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-Д-глюкопиранозид), который под действием глюкозидазы энтерококков и Д-стрептококков образует растворимый продукт синезеленого цвета.

Рост сопутствующих грамотрицательных бактерий (колиформные бактерии), также имеющих бета-Д-глюкозиды, подавляется наличием в бульоне азида натрия. Необходимо иметь в виду, что дифференциальные свойства хромогенных сред могут быть значительно ослаблены тем, что протеолитические, окислительно-восстановительные или сахаролитические ферменты микроорганизмов весьма разнообразны и универсальны, т.е. часто встречаются у микроорганизмов разных видов. В этой связи основной акцент при их разработке делается на повышение селективности, позволяющей идентифицировать бактерии до рода и вида.

Наиболее широкое практическое применение нашли среды с рН-индикаторами. Их механизм действия основан на изменении окраски индикатора при изменении рН среды. Ферментация аминокислот или аммиака приводит к защелачиванию среды, а ферментация сахаров – к закислению. В качестве примера служат хромогенные среды для выделения и идентификации микоплазм (питательная среда «микоплазма-50» для *Mycoplasma hominis* и питательная среда «Уреоплазма» для *Ureaplasma urealyticum*). Механизм их действия основан на повышении рН среды при ферментации мочевины («Уреоплазма -50») или аргинина («Микоплазма-50»), в результате чего при наличии в исследуемой пробе *Mycoplasma hominis* цвет меняется с зеленого на фиолетовый, а при наличии *Ureaplasma urealyticum* – с желтого на красно-малиновый.

В практическом отношении более приемлемыми являются плотные хромогенные среды. Механизм их действия также заключается во взаимодействии высокоспецифичных ферментов бактерий с хромогенным субстратом, играющих роль индикатора. В жидких средах продукты ферментации субстрата водорастворимы, что изменяет цвет среды, а в плотных средах они не растворимы и поэтому изменяется только цвет колоний микроорганизмов. Плотные хромогенные среды по сравнению с жидкими обладают следующими преимуществами. При их применении идентификация возбудителя происходит одновременно с его выделением и не требует проведения специальных посевов с целью получения чистой культуры, к тому же можно оценить спектр патогенов в пробе и их относительное количество. Требования к селективности плотных сред ниже, чем требования к селективности жидких сред, что позволяет идентифицировать на них широкий спектр микроорганизмов, принадлежащих к

разным родам и видам.

Компания «Himedia» выпускает хромогенные питательные среды для обнаружения и дифференциации *E.coli* и колиформных бактерий, среды для выделения сальмонелл, для изоляции и идентификации дрожжевых и плесневых грибов, выделения и идентификации *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, энтерококков, уропатогенов и других микроорганизмов.

Продукцией компании являются многочисленные добавки для хромогенных питательных сред. Так, добавка для выделения *Enterococcus faecium* рекомендуется для дифференциации *E. faecium* и *E. faecalis*.

Селективная добавка для метициллин резистентных *S. aureus* содержит в своем составе метициллин и рекомендуется для выделения устойчивых к этому антибиотику стафилококков. Известны селективные добавки для выделения стрептококков группы В, сальмонелл, листерий, энтерококков, для дрожжевых и плесневых грибов, коринебактерий, клостридий и других микроорганизмов.

Компания «Himedia» предлагает для биохимической идентификации микроорганизмов ряд наборов: набор для биохимической идентификации энтеробактерий, стафилококков, вибрионов, нейссерий, сальмонелл, листерий и другие наборы для идентификации других бактерий. Продукцией компании являются питательные среды в водорастворимых капсулах, питательные среды в гранулированной форме, микробиологические питательные среды, готовые к употреблению, многочисленные компоненты питательных сред, добавки к питательным средам, диагностические диски и полоски.

Значительный интерес для микробиологической практики представляют диагностические диски, например, такие как дифференциальные диски с факторами X/V/X+V, диски с оптохином, диски с бацитрацином и другие.

Диагностические диски пропитаны химическими веществами, также как и полоски, и при нанесении их на поверхность, в глубину питательных сред или непосредственно в микробную суспензию можно проводить идентификацию и дифференциацию микроорганизмов, что весьма практично и ценно. Например, дифференциальные диски с факторами X/V/X+V используют для предварительной идентификации представителей рода *Haemophilus* по потребности в факторах роста X, V или (X+V). Стерильные бумажные диски диаметром 6 мм, пропитанные факторами X (гемин) и /или V (никотинамидадениндинуклеотидом, НАД), раскладывают на поверхности кровяного агара в чашках Петри и помещают в термостат при 35-37°C на 24-48 часов. Микроорганизмы с потребностью только в гемине (фактор X) растут вблизи дисков с факторами X или X+V, с потребностью только в НАД, вокруг дисков с факторами V или X +V. При потребности в обоих факторах рост отмечается только возле диска X+V.

Диски с оптохином используют для идентификации и дифферен-

циации *Streptococcus pneumoniae* и «зеленящих» стрептококков. Последние бактерии в отличие от возбудителей пневмонии способны расти на питательных средах в присутствии оптохина.

Кроме вышеуказанных дисков, используют и многие другие диски для идентификации других видов бактерий.

Диагностические полоски используют в основном для определения способности микроорганизмов продуцировать сероводород, индол, а также для контроля тепловой и «холодной» стерилизации, т.е. с использованием ионизирующего излучения.

Компания «Himedia» реализует готовые к применению бакпечатки для клинической микробиологии, биотехнологии, мясной, молочной и пищевой промышленности, санитарной и ветеринарной микробиологии. Бакпечатки компании представляют собой модифицированный вариант стандартных чашек Петри. Они обладают многими преимуществами: простота использования, отсутствие необходимости готовить питательные среды, полная готовность к проведению баканализов, высокое качество сред, возможность оценить количество микроорганизмов без последующего подтверждения, удобство применения без дополнительных инструментов и реагентов, значительное уменьшение трудозатрат.

Бакпечатки представляют собой небольшого размера чашки диаметром 55 мм, заполненные питательной средой в количестве 5 см³ и закрытые крышкой для обеспечения стерильности. На чашках имеются метки для подсчета колоний. Чашки удобны в работе и манипуляции с ними просты.

При применении бакпечатки открывают крышку чашки, извлекают агаровую пластинку за специальную выступающую часть и агаровую поверхность ее прикладывают к тестируемой поверхности на 15-20 секунд. Затем, агаровую пластинку помещают в корпус бакпечатки, закрывают крышкой, помещают в термостат и инкубируют согласно рекомендациям для той среды, которой заполнена бакпечатка.

В настоящее время разработаны бакпечатки для выявления и подсчета аэробных и колиформных микроорганизмов, *Staphylococcus aureus*, кисломолочных бактерий, дрожжей и плесеней, для подсчета всех колиформных микроорганизмов, наряду с подсчетом числа *E. coli*.

Заслуживают внимания предлагаемые компанией «Himedia» системы для выделения гемокультур. Действительно, кровь является важнейшим материалом, поступающим для исследования в лабораторию. Известно, что в норме кровь стерильна, поэтому выделение гемокультуры имеет большое значение для диагностики, например, эндокардитов, тромбозов, сальмонеллезов, пневмоний, особенно осложненных нагноением.

Естественная бактерицидная или бактериостатическая активность крови, наряду с предшествующей антибиотикотерапией, могут быть причиной отрицательного – или несвоевременно полученного положительного результата исследования на гемокультуру. Потому для инактивации

естественной способности крови и применяемых антибиотиков с целью обеспечения роста бактерий в качестве антикоагулянта можно применять натрияполиэтанолсульфанат. Это вещество подавляет активность стрептомицина, полимиксина, канамицина, гентамицина.

Однофазные системы для гемокультур ХайСейф для аэробных и анаэробных микроорганизмов безопасны, просты и высокоэффективны при их использовании в микробиологической работе.

Несомненный интерес представляют двухфазные системы для аэробов и анаэробов, для грибов, сальмонелл, которые позволяют простое, быстрое и достоверное выделение микроорганизмов в течение минимального по продолжительности времени. Например, диагностика сальмонеллеза рутинными методами занимает обычно 3-4 дня. Предлагаемая компанией Himedia двухфазная система для сальмонелл позволяет определить возбудителя инфекции в течение 24 часов.

2.1. Общие сведения о питательных средах и требования, предъявляемые к ним

Микроорганизмы, за исключением облигатных внутриклеточных (хламидии, риккетсии), культивируют на питательных средах. Выращивание бактерий осуществляют, преследуя научно-исследовательские цели, т.е. получение определенного количества бактериальной массы и изучения химического состава бактерий, их физиологии, генетики и т.д. Постановка лабораторного диагноза при различных инфекционных болезнях диктует сугубо практическую необходимость выделения чистой культуры патогена и ее идентификации. Для этого нужны качественные питательные среды. Среда необходима также для поддержания и длительного хранения ценных производственных и музейных штаммов микроорганизмов, санитарно-бактериологической оценки продуктов питания для людей, кормов для животных и т.д.

Производство вакцин, гипериммунных сывороток, иммуноглобулинов, анатоксинов, диагностических препаратов и т.д. не осуществимо без использования питательных сред. Питательные среды широко применяют в промышленной микробиологии, одной из главных задач которой является увеличение выхода целевого продукта. Выход продукта по отношению к использованной питательной среде называют экономическим коэффициентом. Чем выше этот коэффициент, тем выше продуктивность биотехнологического процесса. При низкой продуктивности производство оказывается нерентабельным и неконкурентоспособным. Необходимо заметить, что любая микробиологическая работа требует наличия питательных сред для культивирования бактерий. Питательная среда должна включать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки – источники углерода, азота, макро- и микро-элементы, ростовые вещества.

В настоящее время многие виды микроорганизмов широко используют в различных сферах человеческой деятельности:

- для производства алкогольных напитков (пиво, вино, спирт), продуктов питания (хлеб, молочно-кислые, заквашенные и соляные продукты, рыбные и мясные продукты ферментации);

- для производства микробного белка (пищевого и кормового) и пищевых добавок;

- для получения индивидуальных химических веществ (растворители, газы, ферменты, витамины, антибиотики, органические и аминокислоты, нуклеотиды, биополимеры, алкалоиды, стероиды, гормоны, токсины, стимуляторы роста растений и т.д.);

- при выщелачивании металлов из руд;

- для очистки и переработки промышленных и бытовых отходов;

- при создании замкнутых систем жизнеобеспечения;

- при применении микроорганизмов в качестве тест-систем и биосенсоров;

- при применении бактерий в качестве моделей и инструментов научных исследований.

Однако, необходимо подчеркнуть, что без питательных сред использование микроорганизмов в различных областях человеческой практики, невозможно.

Мир микробов обширен и разнообразен. Конструктивные и энергетические возможности микроорганизмов также разнообразны. Индивидуальные потребности отдельных видов бактерий в питательных веществах различны. Поэтому универсальной питательной среды, пригодной для культивирования всех видов микроорганизмов, не существует.

Разнообразие метаболизма бактерий проявляется, прежде всего, в их отношении к источникам углерода и азота. Эти элементы представлены в средах различными веществами, и они в наибольшей степени определяют специфичность сред.

Основное внимание надо уделять источникам азота. Все искусственные питательные среды, изготавливаемые в лаборатории, в биологической промышленности, выпускаемые централизованно (сухие питательные среды), имеют в своей основе вещества, содержащие азот. В качестве азотистого субстрата для изготовления питательных сред, особенно в больших количествах (на биофабриках), служит мясо (преимущественно говяжье). Требования микроорганизмов к источнику азота неодинаковы. Для культивирования микробов, фиксирующих молекулярный азот, используют среды, не содержащие соединений азота. В состав других сред входят разнообразные азотсодержащие соединения: нитриты, соли аммония, одна или несколько аминокислот. Известны микроорганизмы, нуждающиеся в полном наборе аминокислот или белках.

Автотрофные микроорганизмы способны использовать в качестве единственного источника углерода углекислоту воздуха или карбонатов. Гетеротрофные микроорганизмы такими соединениями углерода не мо-

гут быть удовлетворены. Для развития гетеротрофных микробов в среде должны быть более восстановленные соединения углерода, которые обычно представлены различными органическими веществами. Источники углерода многочисленны и многообразны. Это, в первую очередь, сахара, многоатомные спирты, кислоты. Углерод является составной частью всех органических соединений – белков, пептонов, аминокислот и других. В этой связи специальные дополнительные источники углерода в питательных средах не нужны.

Снабжение бактерий в питательных средах водородом и кислородом обеспечивается за счет воды. Для нормального развития многих групп микроорганизмов нужны макро- и микроэлементы, потребность в которых удовлетворяется за счет одних и тех же минеральных солей.

Кроме основных компонентов питательной среды (пластических, энергетических, зольных), для нормального развития микробов необходимы еще так называемые «факторы роста». Этими факторами являются, в основном, витамины группы В. Они играют важную роль регуляторов и стимуляторов обмена веществ у микробов.

При конструировании питательных сред для каждого определенного вида бактерий необходимо учитывать особенности метаболизма их и индивидуальные потребности в тех или других питательных веществах. Среды для одного и того же вида микроорганизмов могут быть разными, в зависимости от практических потребностей и задач исследований. Например, среда для длительного хранения ценных музейных штаммов может значительно отличаться от сред, предназначенных для промышленного изготовления биопрепаратов диагностического, профилактического и лечебного назначения.

Несмотря на громадное количество предложенных сред и их модификаций, к ним предъявляются следующие общие требования.

Питательные среды должны содержать необходимые вещества, обеспечивающие метаболизм бактерий. В их состав в обязательном порядке должны входить органогены (С, N, H, O), макроэлементы (хром, медь, магний, кобальт и др.), ростовые факторы (витамины, гормоны). В рецептуре питательных сред все необходимые вещества должны быть представлены в легкоусвояемой для микробов форме.

Питательные среды, в зависимости от того, для выращивания какого вида бактерий предназначены, должны иметь определенный показатель концентрации водородных ионов – рН. Оптимальным при культивировании большинства патогенных микробов рН колеблется в диапазоне 7,2-7,4.

Среды должны быть изотоничными, т.е. осмотическое давление как внутри бактериальной клетки, так и вне ее, должно быть одинаковым. Оптимальным для жизнедеятельности большинства бактерий является давление, соответствующее 0,5%-ному раствору поваренной соли.

Стерильность питательных сред – важнейшее требование, предъявляемое к ним. Изучить биологические свойства микроорганизмов, инте-

ресующих исследователя, выделить чистую культуру, идентифицировать ее без стерильных питательных сред невозможно.

Бактериям присущ голофитный способ питания. Питательные вещества поступают в клетку путем диффузии и осмоса. Поэтому питательные среды должны содержать не менее 60% влаги.

Питательные среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т.е. «соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом гН. Этот индекс показывает насыщение среды кислородом. Для разных микробов нужен различный потенциал. Так, анаэробы размножаются при гН - не выше 5, аэробы при гН не ниже 10.» (А.А. Солонко, А.А. Гласкович, В.Н. Алешкевич, Ф.Е. Тимофеев, Н.Х. Федосова, 2000).

Питательные среды по возможности должны содержать одинаковое количество некоторых соединений. Например, для выращивания большинства видов патогенных микробов в средах должно содержаться 0,8-1,2 г/л аминного азота, 2,5-3,0 г/л общего азота, 0,5 г/л хлоридов, 1% пептона.

Для того, чтобы следить за ростом бактерий, изучить его характер, визуально обнаруживать рост посторонних микроорганизмов, необходимо, конечно же, с учетом вида культивируемых микробов, иметь прозрачные среды.

2.2. Классификация питательных сред

На протяжении всей истории микробиологии питательные среды совершенствовались. До классических работ Л. Пастера в качестве сред для культивирования бактерий применялись только настои и отвары. Л. Пастер и К. Негели предложили для выращивания микробов безбелковые среды. Р. Кох и Ф. Леффлер для культивирования микробов использовали мясную воду. По мере развития микробиологии, открытия все новых и новых видов бактерий, было предложено большое количество питательных сред. Появилась необходимость в их классификации.

В настоящее время питательные среды классифицируют по происхождению, консистенции, назначению. По происхождению среды могут быть естественными, искусственными и синтетическими.

К естественным средам относят среды животного и растительного происхождения. В качестве примера можно указать на молоко, сыворотку крови, яйцо, картофель, свеклу, овощные или фруктовые соки и т.д. На этих средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в них имеются, в основном, все необходимые компоненты для роста и размножения микробов.

Искусственные питательные среды готовят по специальным методикам из продуктов растительного и животного происхождения с добавлением пептона и солей. Эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав, и их применение ограничено при изучении физиологии микробов. Однако эти среды нашли широкое применение в лабораторной

практике и биологической промышленности.

Синтетические среды – это среды, которые состоят только из определенных химически чистых реактивов, взятых в точно указанных концентрациях. Эти среды используют для изучения обмена веществ микроорганизмов, так как, зная точный состав и количество входящих в среду компонентов, можно определить потребление и превращение их в определенные продукты метаболизма. К этим средам можно отнести среду Сотона для выращивания туберкулезных бактерий, среду для выращивания *B. subtilis*, среду Филдса для культивирования протей и другие.

По консистенции питательные среды подразделяют на плотные, полужидкие и жидкие.

Плотные среды содержат 2-3% агар-агара, полужидкие – 0,15-0,4%. Для уплотнения сред чаще всего применяют агар-агар. Кроме этого, используют желатину, силикагель. Агар-агар представляет собой сложный полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей. Агар-агар обладает способностью связывать большое количество воды и тем самым уплотнять среду. Основными компонентами агара являются высокомолекулярные вещества – агароза и агаропептин. Они обладают высокой устойчивостью к ферментативному действию микробов.

Желатина – белок, получаемый путем вываривания фасций, связок, сухожилий, суставов. Желатин разжижается при 25-30°C, поэтому на питательных средах с добавлением 10-15% его, микроорганизмы выращивают при комнатной температуре.

Силикагель, или кремнекислый гель – вещество неорганической природы. Его используют как плотную основу для синтетических сред строго определенного состава.

Плотные среды чаще всего применяют для выделения чистых культур, количественного учета микроорганизмов, испытания чувствительности бактерий к антибиотикам, определения антагонистических свойств микробов и в ряде других случаев.

Жидкие питательные среды готовят в основном на основе гидролизатов говяжьего мяса. Например, мясо-пептонный бульон, мясная вода, бульон Хоттингера и другие среды. В состав многих жидких питательных сред в качестве одного из компонентов входит пептон. Пептон является промежуточным продуктом распада белков, представляет собой смесь полипептидов и аминокислот.

Жидкие питательные среды широко используют для изучения биохимических свойств бактерий, накопления продуктов обмена микробов, получения большого количества биомассы и в других целях.

Получают полужидкие среды в лабораторных условиях путем добавления в МПБ 0,25-0,3% агара. В качестве основного ингредиента для получения, например, полужидкого мясо-пептонного агара (МППЖА) можно брать мясную воду. Полужидкие среды применяют для изучения подвижности бактерий и хранения ценных производственных и музейных штаммов.

В промышленной микробиологии известны так называемые сыпучие среды. К ним относят разваренное пшено, ячмень, отруби, пропитанные питательным раствором.

По назначению питательные среды подразделяют на:

1. Обычные.
2. Специальные.
3. Дифференциально-диагностические.
4. Селективные.
5. Элективные.
6. Среда обогащения.
7. Консервирующие.

Обычные (простые, основные, универсальные, общеупотребительные) - это мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, содержащие многие питательные вещества, в присутствии которых хорошо растут многочисленные виды как патогенных, так и непатогенных бактерий.

Специальные среды применяют для культивирования бактерий, которые очень плохо растут на обычных средах. К специальным средам можно отнести сахарный бульон для выращивания стрептококков, кровяной агар для культивирования менингококков, сывороточную среду для лептоспир и другие.

Дифференциально-диагностические среды используют для дифференциации определенных видов бактерий с целью постановки диагноза и с научно-исследовательской целью. К этим средам относят среды для определения редуцирующей способности бактерий, для изучения гемолитических, гликолитических свойств микроорганизмов (среды Гисса, мясо-пептонную желатину, среду Эндо, Дригальского, Плоскирева и др.).

Селективные среды предназначены для выделения из патматериала, содержащего смесь бактерий определенного их вида. В частности, эти среды используют с целью дифференциации прототрофных и ауксотрофных микробов (агар Мак-Конки, висмут-сульфитный агар и др.).

Элективные, или избирательные, среды предназначены для культивирования конкретных видов микробов, которые не растут на других средах или же их размножение сильно задерживается (среда Гельберга, среда Петраньяни, щелочная пептонная вода с рН 9,0 для *Vibrio cholerae*).

Среды обогащения, или накопительные – это среды, в которых подавляется рост и размножение одних видов бактерий и, наоборот, происходит интенсивное накопление бакмассы других видов, для которых физиологические потребности в питательных веществах удовлетворяются полностью (среда Кесслера, Мюллера, Кауфмана, селенитовая среда).

Консервирующие среды – среды, предназначенные для задержки роста банальной микрофлоры в патологическом материале, особенно при пересылке его в летнее время на значительное расстояние. В качестве консервирующих сред используют 30%-ный раствор глицерина и вазелиновое масло.

Специалисты биологической промышленности различают еще, так называемые, производственные среды, которые непосредственно предназначены для культивирования микробов в реакторах (бульон Хоттингера, среда Мартена и др.).

В настоящее время многие питательные среды изготавливают фабричным способом и выпускают в виде порошка. Эти среды удобны в работе, стойки и весьма эффективны.

Мы приводим состав некоторых сухих сред и способы их подготовки для культивирования микроорганизмов.

Для приготовления питательного бульона 25 г сухого питательного порошка, выпускаемого промышленностью, растворяют в 1 л дистиллированной воды при подогревании, а затем расфасовывают в колбы, пробирки и стерилизуют.

Из сухого питательного бульона можно готовить обычный бульон, плотную среду – питательный агар, плотные дифференциальные среды и дифференциальные среды с углеводами.

Из сухого питательного агара питательную среду готовят следующим образом. В 1 л дистиллированной воды растворяют 50 г порошка, устанавливают требуемое значение рН, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, расфасовывают и стерилизуют при 120°C в течение 25-30 минут.

Сухой агар Эндо, выпускаемый промышленностью, содержит в 1 кг: сухого питательного агара - 780 г, лактозы - 196 г, фуксина основного - 5 г, натрия фосфорнокислого - 10 г, кальцинированной соды - 3-5 г, спирта ректификата - 10 г, спирта технического - 5 г, сульфата натрия - 8,6 г. Для приготовления среды Эндо 15 г порошка растворяют при нагревании в 300 см³ дистиллированной воды и кипятят при постоянном помешивании 2-3 минуты. Растворенную среду охлаждают до 50°C и вносят по 20-25 см³ в чашки Петри. После застывания чашки подсушивают в термостате и используют по назначению.

Сухой агар Плоскирева имеет сложный состав, 1 кг которого содержит: сухого питательного агара - 420 г, желчных солей - 121 г, лимонно-кислого натрия - 144 г, гипосульфита - 120 г, лактозы - 123 г, натрия фосфорнокислого - 40 г, бриллиантовой зелени - 0,02 г, кальцинированной соды - 0,04 г, йода металлического - 6 г, поваренной соли - 40 г.

Для приготовления среды Плоскирева берут 18 г сухого порошка и растворяют при нагревании в 300 см³ дистиллированной воды, кипятят 2-3 минуты, а затем, не охлаждая разливают по чашкам Петри, подсушивают и применяют для выделения патогенных энтеробактерий.

Сухой агар с эозином-метиленовой синькой (среда Левина) предназначена для выделения микробов кишечной группы. В состав 1 кг сухого агара входят: сухого питательного агара - 660 г, лактозы - 147 г, сахарной пудры - 185 г, эозина - 7,6 г, метиленовой синьки - 1,5 г, натрия фосфорнокислого - 15 г, кальцинированной соды в количестве необходимом для получения рН 7,3, спирта ректификата - 10 г, спирта технического - 5 г.

Для приготовления среды 15 г порошка растворяют при подогревании в 300 см³ дистиллированной воды, кипятят 3-5 минут, не допуская пригорания, охлаждают до 50°С и разливают по 20-25 см³ в стерильные чашки Петри, подсушивают в термостате при 37°С и используют в микробиологической работе.

Для выделения из патматериала и дифференциации сальмонелл от эшерихий используют среду Вильсона-Блэра. Для приготовления этой среды берут сухой висмут-сульфитный агар, в состав одного килограмма которого входят: сухой питательный агар - 732 г, цитрат висмута - 37 г, глюкоза - 72 г, соль Мора - 15 г, сульфат натрия - 86 г, натрий фосфорнокислый - 65 г, бриллиантовая зелень - 0,4 г, сода кальцинированная - 65 г, спирт-ректификат - 10 г, спирт технический - 5 г. Среду из порошка готовят следующим образом. Отвешивают 9 г порошка и растворяют в 150 см³ дистиллированной воды. В процессе растворения порошка воду подогревают. После растворения порошка среду кипятят 2-3 минуты, не допуская пригорания. Затем среду охлаждают до 50°С и расфасовывают в стерильные чашки Петри. Застывшую в чашках среду перед посевом подсушивают в термостате при 37°С.

Сухие среды с углеводами и индикатором ВР (смесь водного голубого красителя с розоловой кислотой) предназначены для приготовления полужидких сред с углеводами, применяемыми для изучения гликолитической активности микроорганизмов. Выпускаемые сухие среды содержат в расчете на 1 кг: питательного агара - 620 г, углеводов (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, маннит) - 230 г, натрия хлорида - 160 г, натрия фосфорнокислого - 70 г, красителя водного голубого - 70 г, розоловой кислоты - 0,8 г, кальцинированной соды - 20 г, спирта – ректификата - 10 г, спирта технического - 5 г. Способ приготовления среды из сухого порошка сводится к следующему: в 100 см³ дистиллированной воды растворяют при подогревании 2 г порошка, раствор доводят до кипения, затем разливают по пробиркам и стерилизуют автоклавированием 20 минут при 120°С.

Применение сухих питательных сред является весьма целесообразным как для лабораторий медицинского назначения, так и ветеринарных лабораторий. Их использование освобождает сотрудников лабораторий от довольно длительного и громоздкого процесса получения питательных сред. Сухие среды обладают более стандартными свойствами, что позволяет до некоторой степени сравнивать результаты бактериологических исследований, полученных в разных лабораториях. Сухие среды удобны при проведении опытной работы в полевых условиях и в экспедициях. Сухие среды необходимо хранить в темном месте, герметически закрытыми, учитывая то, что они гигроскопичны и светочувствительны. Изменение цвета сухого порошка, увлажнение его и комкование являются признаками свидетельствующими о снижении качества сухой среды. Сухие препараты, не содержащие глюкозы, даже в случае комкования не меняют своих свойств, однако, перед применением необходимо прове-

ритель их качество. Если в составе среды присутствует глюкоза и в такой среде обнаружено комкование и изменение цвета порошка, применение ее запрещается.

Обычно, на емкостях с сухими средами имеются этикетки, на которых указывают наименование среды, ее состав, способ приготовления и назначение для использования.

В практике производства сухих питательных сред используют в настоящее время различные способы сушки: конвективную сушку с применением ленточных сушилок ПКС-20, сушку на сушилках СП-100 в так называемом «псевдокипящем» слое, распылительную и сублимационную сушку. Область каждого из приведенных способов сушки ограничена конструктивными и технологическими возможностями сушильных аппаратов. Так, сушка гидролизата проводится только распылением или сублимацией, агаро-белковые основы питательных сред сушат на ленточных сушилках ПКС-20 и в «псевдокипящем слое» на СП-100.

Поэтому в промышленности постоянно идут поиски более совершенных и экономически выгодных способов сушки не только питательных сред, но и многих биопрепаратов.

П.Ш. Гашимова, А.М. Алиев, А.К. Мерабашвили, М.К. Садуллаев (1979), сотрудники Дагестанского научно-исследовательского института питательных сред и Дагестанского политехнического института, выполнили большую и необходимую работу по пеносушке питательных сред. По их мнению, пеносушка является новым и перспективным методом обезвоживания не только жидких, но и пюре - и пастообразных питательных сред. Проведенные авторами предварительные исследования показали, что гидролизаты всех видов, агарово-белковые основы, желчные соли и т. д. обладают хорошими пенообразующими свойствами и дают стабильные пены, пригодные для сушки без введения каких бы то ни было ПАВ (поверхностно-активных веществ).

В процессе опытной работы исследователи использовали производственные серии гидролизатов из различного вида белкового сырья: кормовых дрожжей, рыбы, казеина, кроме этого, они апробировали сушку агаро-белковых основ вышеперечисленных гидролизатов, желчных солей. Содержание агара и гидролизата в агаро-белковой основе варьировало в широких пределах. Пену получали механическим путем в цилиндрической емкости с помощью якорной мешалки при комнатной температуре. Сушку вспененного продукта вели в экспериментальной конвективной сушилке. Оптимальный режим сушки был выбран на основе математического планирования эксперимента.

Авторами было доказана технологичность метода пеносушки, которая обусловлена не только возможностью сушки широкого ассортимента белкового сырья, но и сокращением производственного цикла получения сухих питательных сред, что делает способ экономически эффективным и перспективным.

Питательные среды, полученные методом пеносушки, по физико-химическим и бактериологическим показателям не уступают средам, полученным другими сопоставимыми способами.

В.Н. Егорова, Э.Ф. Токарик, М.Е. Ефимова, Ю.И. Тараканов, Н.Д. Скичко (1976) проведенными исследованиями доказали возможность использования метода распылительной сушки для производства сухих питательных сред и различных компонентов для них. Полученные авторами препараты сухих питательных сред обладали хорошей растворимостью, не изменяли своих свойств в течение года хранения в защищенном от света месте при комнатной температуре. Исследователи испытали пять приготовленных ими серий ферментативного гидролизата казеина для культивирования *Brucella abortus* штаммов 19 и 82. Было установлено одинаковое накопление бруцелл как при культивировании их на средах, содержащих жидкий, так и на средах, содержащих сухой ферментативный гидролизат казеина.

Синтетические среды – это среды, приготовленные «из определенных химически чистых неорганических и органических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде» (А.А. Солонко, А.А. Гласкович, В.Н. Алешкевич, Ф.Е. Тимофеев, Н.Х. Федосова, 2000).

Для приготовления синтетических сред используют только химически чистые реактивы. В лаборатории все продажные реактивы подвергают двукратной кристаллизации или специальной очистке. Необходимо иметь в виду, что обычная дистиллированная вода содержит незначительное количество тяжелых металлов, оказывающих негативное влияние на культивируемые бактерии. Поэтому при получении синтетических сред лучше использовать бидистиллированную воду.

При необходимости применения агара в качестве уплотняющего компонента его измельчают, три дня промывают в проточной воде, восемь дней в дистиллированной воде, которую меняют ежедневно, затем сушат в теплом помещении. После этого агар заливают дистиллированной водой и отстаивают две недели при комнатной температуре. По окончании срока отстоя, воду сливают, а агар промывают, как указано выше, сушат и используют в качестве уплотнителя сред.

Рецепты отдельных синтетических сред мы приводим ниже.

Среда Бейеринка для выращивания аэробного фиксатора азота: маннита – 20 г, фосфорнокислого калия двузамещенного – 0,2 г, мела – в избытке, воды водопроводной – 1000 см³.

Среда для культивирования *B. subtilis*: хлористого аммония или азотнокислого калия – 10 г, глюкозы – 10 г, фосфорнокислого калия двузамещенного – 1 г, сернокислого аммония – 1 г, хлористого кальция – 0,1 г, хлористого натрия – 0,1 г, воды дистиллированной – 1000 см³.

Среда Козера для выращивания кишечной палочки: фосфорнокислого аммония однозамещенного – 1 г, источника углерода – 2 г, хлористого натрия – 5 г, сернокислого магния – 0,2 г, фосфорнокислого калия

двузамещенного – 1 г, воды - 1000 см³.

Аминокислотная среда для выращивания различных видов бактерий: фосфорнокислый калий двузамещенный – 1 г, сернокислый магний – 0,2 г, хлористый натрий – 0,02 г, сернокислое железо – 0,01 г, агара – 16 г, воды - 1000 см³.

К среде добавляют аминокислоты – валин, глицин, бетаин (основной), бетаин солянокислый, аланин, фенилаланин, лейцин, аспарагиновую кислоту, глютаминовую кислоту и аспарагин в концентрации 0,02 М.

Среда Сотона для выращивания туберкулезных бактерий: аспарагин 4 г, лимонная кислота – 2 г, лимоннокислое аммиачное железо – 0,05 г, сернокислое магnezия – 0,5 г, двухосновной фосфорнокислый калий – 0,5 г, глицерин – 60 см³, воды - 200 см³.

Ингредиенты, входящие в состав среды Сотона, растворяют при подогревании, фильтруют через бумажный фильтр, добавляют 800 см³ воды, подщелачивают аммиаком до pH 7,2, стерилизуют при 115-120°C в течение 30 минут.

Реакцию синтетических питательных сред корректируют редко, так как она остается в пределах 6,8-7,2, т.е. оптимальной для большинства патогенных микроорганизмов.

В синтетических питательных средах для микробов в качестве источника фосфора выступают первичный и вторичный фосфат кальция. Кроме неорганического фосфата, в питательные среды могут добавлять органический фосфат, например, нуклеиновые кислоты и фитин. Однако, из-за добавления этих соединений, среды приобретают следующие недостатки:

- при приготовлении питательных сред могут осажаться трудно-растворимые неорганические соединения фосфора;
- фосфор растворимых неорганических соединений незамедлительно используется микробами;
- органические соединения фосфора часто оказывают отрицательное влияние на интенсивность роста микроорганизмов.

Чтобы устранить указанные недостатки, а также, учитывая потребность микробов в азоте, при конструировании синтетических сред рекомендуется использовать в качестве источников азота и фосфора:

- триамид окиси фосфора и его производные;
- нитридамид фосфора;
- эфиры фосфорной кислоты, амиды эфиров фосфорной и тиофосфорной кислот;
- амиды фосфорной кислоты и амиды эфиров фосфорной кислоты;
- амиды уранодофосфорной и амидополифосфорной кислоты;
- щелочные фосфаты, щелочно-земельные дицианамидофосфаты, а также их сложные алкиловые эфиры и тиопроизводные;
- щелочные метафосфаты и полифосфаты аммония;
- дифосфат аммония и щелочно-аммонийный фосфат.

Все эти соединения используются микробами как питательные ве-

щества. Некоторые из них усваиваются бактериями медленно. Упомянутые вещества могут усваиваться микроорганизмами после их гидролиза и оказывать влияние на обмен веществ у бактерий. Они влияют на скорость роста, спорообразование у грибов, на величину рН питательной среды, концентрацию фосфора и азота в сухой массе микробных клеток и т.д. Соединения фосфора и азота можно применять для приготовления синтетических питательных сред для бактерий, актиномицетов, микроскопических грибов.

Согласно сообщению Л.Я. Телишевской и С.П. Сергеевой (2001), для производства пептона использовалось сотрудниками ВГНКИ растительное сырье – жмыхи масленичных культур – плодов тунгового дерева и семян хлопчатника. Гидролиз растительного сырья проводили ферментами животного происхождения: пепсином, трипсином. В процессе опытной работы было показано, что растительные белки подвергаются расщеплению аналогично животным – при гидролизе пепсином с образованием высокомолекулярных пептидов, при гидролизе панкреатином – аминокислот и пептидов. В составе питательных сред растительные гидролизаты оказались вполне эффективными. Полученные питательные среды были апробированы на Табахмельском биокомбинате для культивирования производственного штамма *S. chauvoei* с последующим использованием культур бактерий для изготовления вакцин против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота. Приготовленные серии вакцин прошли государственный контроль и были признаны годными для практического применения.

Сотрудниками ВГНКИ была испытана возможность изготовления смешанного пептона из растительных и животных белков: из гидролизатов фибрина и тунгового жмыха. Положительные результаты опытов позволили рекомендовать смешанный пептон для изготовления питательных сред.

Питательные растительные среды известны в микробиологии давно. Приготовление некоторых растительных сред мы приводим ниже.

Среда из картофеля. Отобранные клубни картофеля из белых сортов моют, очищают от кожуры и опускают на 2-3 часа в 1%-ный раствор соды с целью нейтрализации кислой реакции. Стерильным ножом или скальпелем нарезают ломтики картофеля и помещают их в специальные пробирки с перехватом внизу, на котором ломтики задерживаются. Пробирки стерилизуют при 115°C, при этом следят, чтобы вода при варке картофеля оставалась на дне пробирки и не касалась картофеля.

Среда Цуверкалова и Саркисова. К 1 кг картофельной мезги добавляют 5 литров дистиллированной воды и 15 см³ серной кислоты (удельный вес 1,84). Гидролизуют при 1,5 атм. в течение 1,5 часов. Затем жидкость пропускают через марлю, оставшуюся мезгу отжимают. Гидролизат фильтруют через бумагу и добавляют к нему 6 л воды, нагревают и нейтрализуют поташом до рН 7,0. На каждый литр добавляют 5 г щавелевокислого аммония, 10 см³ глицерина, 3,76 г двухосновного фосфорнокис-

лого натрия и 1,23 г одноосновного фосфорнокислого калия. Среда должна иметь рН 7,2-7,4. Среду отстаивают 2 часа, фильтруют и стерилизуют текучим паром по 30 минут 2 дня подряд.

Глицериновый картофель по Павловскому.

Картофель моют, снимают кожуру и погружают на полчаса в 1%-ный раствор сулемы. Затем промывают 10-12 часов в проточной воде, вырезают клиньями, помещают в пробирки с перетяжками, куда предварительно вносят 1 см³ 5%-ного раствора глицерина, стерилизуют и используют для культивирования туберкулезных бактерий.

Картофель с желчью (Среда Кальметта и Герена). Ломтики картофеля погружают в профильтрованную и стерилизованную желчь, к которой предварительно добавлено 5% глицерина. Смесь прогревают в водяной бане 3 часа при 75°C. Затем ломтики картофеля переносят в пробирки с перетяжкой, до которой налита стерильная желчь с 5% глицерина. Среду стерилизуют 30 минут при 120°C.

Желчь стерилизуют предварительно дробно при 100°C по полчаса, трехкратно, отстаивают в течение 3 недель, фильтруют через вату и используют.

Картофельный агар:

Очищенный картофель, нарезанный ломтиками – 200 г, L-яблочная кислота – 2,5 г, нерафинированный тростниковый сахар – 2,5 г, КОН – 2 г, раствор витаминов (биотин - 10 мг, пиридоксин - 20 мг, дистиллированная вода - 100 см³) – 1 см³, бромтимоловый синий (0,5%-ный спиртовой раствор) – 2 кап., агар – 15 г, дистиллированная вода – 1000 см³.

Картофель в марлевом мешке кипятят 30 минут в 1 л воды. Яблочную кислоту растворяют в 50 см³ воды и добавляют 2 капли бромтимолового синего и КОН, пока раствор яблочной кислоты не станет зеленым (рН 7,0). Этот раствор, а также тростниковый сахар, витамины и агар добавляют к картофельному фильтрату. Дистиллированной водой доводят объем раствора до 1 литра, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин. при 121°C.

2.3. Приготовление питательных сред

2.3.1. Общие положения о гидролизе белков и назначении гидролизатов

Гидролиз белков является необходимым и распространенным явлением в природе. Белки представляют собой высокомолекулярные органические соединения. Это полимеры, мономерами которых являются аминокислоты. Благодаря гидролизу обеспечиваются деструкция и разрушение белковых тканей отживших организмов, что способствует освобождению структурных элементов для новых актов созидания и синтеза. Основная роль в этом процессе принадлежит микроорганизмам – санитарам природы (Л.Я. Телишевская, 2002).

В организме человека и животных с гидролиза белка начинается его усвоение из пищи в пищеварительном тракте – одной из первых звеньев длинной цепи обмена веществ.

Гидролиз белков представляет собой процесс расщепления их молекулы с деструкцией первичной структуры (полипептидной цепи). Гидролиз может происходить в результате воздействия на белки физических факторов (температуры, давления), химических веществ (кислот, щелочей) или протеолитических ферментов.

Продуктами полного гидролиза белков являются аминокислоты, частично – аминокислоты и пептиды. При проведении гидролиза с научно-исследовательской целью (аналитической целью) гидролиз осуществляют до полного расщепления белка с образованием составляющих его аминокислот. Гидролизаты, получаемые для сугубо практического использования, как правило, содержат аминокислоты и пептиды. Если в гидролизатах преобладают аминокислоты, такой гидролиз расценивают как полный, если пептиды – как частичный.

Гидролизаты средней глубины гидролиза содержат примерно равные количества аминокислот и пептидов.

В зависимости от способа гидролиза его продуктами могут быть пептиды, имеющие разную длину молекул. Как утверждает Л.Я. Телишевская: «Высокомолекулярные пептиды – фракции с м.м. более 5000 Д – в литературе обозначались как первичные протеозы или высокомолекулярные альбумозы; полипептиды с м.м., соответствующими примерно 1500-5000 Д, называли среднемолекулярными пептидами, вторичными протеозами или альбумозами; пептиды менее 1500 Д – пептонами».

Согласно Л.Я. Телишевой (2000), расщепление белка представляется следующим образом:

Белок → Протеозы <5000 → Пептоны <2000 → Пептиды м.м. до 5000Д → Дипептиды → Аминокислоты.

Метаболизм белков *in vitro* начинается с их ферментативного расщепления. Получаемые при этом соединения азота – аминокислоты и пептиды – легко усваиваются макро- и микроорганизмами.

Опыты по получению гидролизатов и их использованию в бактериологии и терапии проводились в одни и те же годы в конце 19-го – начале 20-го столетия Робертом Кохом и Леффлером – для культивирования бактерий, Абдерхальденом и Рона – для парентерального введения. В 1913 – 1914 гг. В. Хенрике и А. Андерсен впервые использовали ферментативный гидролизат мяса для внутривенного введения животным, Хоттингер – для бактериальных питательных сред.

Первым сырьем для гидролиза было мясо и мясопродукты (М.А. Бабич, 1950), первыми гидролизующими агентами – кислоты (соляная и серная) и ферменты желудочно-кишечного тракта (трипсин, панкреатин, пепсин).

В настоящее время гидролиз осуществляют методами физического воздействия, которые обеспечивают разрыв пептидных связей. Это вари-

анты термической обработки материала: длительное кипячение, нагревание паром, воздействие паром под давлением. Однако, в лабораторных и производственных условиях преимущественно используют химические или же ферментативные способы гидролиза.

Химические методы применяют для полного и частичного гидролиза белков, а в некоторых случаях - для избирательного (точечного) разрыва пептидных связей. В практике чаще используют кислотный гидролиз, реже – щелочной.

Кислотный гидролиз проводят с помощью минеральных кислот при повышенных температурах. Воздействием на белок концентрированных кислот при нагревании в течение достаточно продолжительного времени можно добиться полного расщепления его до аминокислот.

Для гидролиза с целью определения аминокислотного состава белков необходимо соблюдать следующие условия: применять хорошо очищенную концентрированную соляную кислоту, производить нагревание смеси при температуре 100-120°C в запаянных ампулах, продолжать гидролиз 10-24 часов в вакууме или атмосфере инертного газа (азота, аргона).

Для гидролиза белковых материалов в практических целях используют меньшие концентрации кислоты и меньшую продолжительность обработки. С помощью варьирования концентрации кислоты и времени гидролиза можно получать гидролизаты с разной глубиной расщепления. В практике кислотный гидролиз обычно проводят серной или соляной кислотой, хотя можно использовать и другие минеральные кислоты. При получении препаратов для парентерального применения сернокислотный гидролиз проводят в течение 3-5 часов при температуре 120-130°C и давлении 2-3 атм, а солянокислый – в течение 5-22 часов при той же температуре и давлении (Л.Я. Телишевская, 2000).

В промышленном производстве достаточно глубокими считаются гидролизаты, имеющие степень гидролиза 55-65% (относительное содержание аминного азота от общего) и степень протеолиза – 90-94% (относительное содержание остаточного азота от общего).

Положительной стороной кислотного гидролиза является возможность получения глубоких гидролизатов в короткие сроки, образование бактерицидных условий в ходе процесса, что предотвращает развитие микроорганизмов и позволяет хранить гидролизат продолжительное время без принятия мер по инаktivации бактерий.

Однако кислотный гидролиз имеет свои недостатки. При нем разрушается часть аминокислот, в том числе полностью – триптофан, что сопровождается образованием летучих аминов и карбонильных соединений. Поскольку кислотный гидролиз не является специфическим для белков, то при кислотнo-термической обработке сложного смешанного сырья происходит одновременное расщепление и других биологических полимеров: нуклеиновых кислот, полисахаридов. В результате гидролиза сложного сырья образуются не только аминокислоты и пептиды, но и уг-

леводы. При высоких температурах происходит образование из аминокислот альдегида, аммиака, углекислого газа, а из сахара – гексозы – оксиметилфурфузола. Последний и альдегиды, взаимодействуя с новыми молекулами аминокислот, вызывают образование меланоидов, что отрицательно сказывается на качестве питательных сред. Эти вещества при культивировании микроорганизмов сорбируются на клеточных стенках, способствуя процессам окисления, особенно при хранении биомассы в высушенном состоянии, что снижает сроки хранения лиофилизированных препаратов.

Существенным недостатком кислотного гидролиза является высокая агрессивность среды, приводящая к быстрому износу оборудования. В этой связи для проведения процесса используют стеклянные емкости, реакторы из фарфора, титана, нержавеющей стали или с эмалированными покрытиями. Проведение гидролиза в одной и той же емкости много раз ведет не только к ее износу, но и грозит попаданием в гидролизат тяжелых металлов, окислов железа, механических примесей, что является нежелательным.

Щелочной гидролиз белков вызывает рацемизацию большинства аминокислот, разрушение аргинина и лизина. Щелочные гидролизаты, в отличие от кислотных, бесцветны, поскольку в процессе гидролиза не происходит образование меланоидов. Щелочной гидролиз не получил широкого распространения. Метод используют для количественного определения триптофана. Один из способов гидролиза с аналитической целью состоит в следующем. Навеску белка помещают в ампулу, растворяют в растворе едкого натра и продувают азотом. Ампулу запаивают и выдерживают при 105°C в течение 5 часов.

Щелочной гидролиз находит применение в ряде технологий, как самостоятельный процесс. Например, метод используют для дезинтеграции коллагенового и кератинового сырья, для выделения витамина А из печени рыб, получения белкового гидролизата из моллюсков (Л.Я. Телишевская, 2000).

Ферментативные методы гидролиза, в отличие от химических, являются более мягкими и щадящими. Поэтому они получили широкое распространение, их применяют в медицине и ветеринарии для получения гидролизатов с целью приготовления питательных сред.

Ферменты, расщепляющие белки, называют протеолитическими или протеазами (протеиназами), а расщепляющие полипептиды (пептиды) – пептидазами. Гидролиз белков под воздействием ферментов проходит чаще в нейтральной, слабощелочной или слабокислой среде, а в отдельных случаях в щелочных или кислых условиях при оптимальной для этого процесса температуре в диапазоне 35-50°C.

Ферменты, в отличие от кислот и щелочей, действуют только на определенные группы соединений. В частности протеолитические ферменты расщепляют только белки и пептиды. Специфичность отдельных ферментов используют на первых этапах гидролиза белков с целью опре-

деления первичной структуры. Для протеолитического гидролиза используют ферменты животного, грибного и бактериального происхождения, которые классифицируют как гидролазы.

В микробиологии для гидролиза мяса применяют не индивидуальные протеазы, а их комплексы, т.е. ферментные системы животных протеаз – фарш поджелудочной железы крупного рогатого скота или свиней, ткани желудка, сухие ферментативные препараты на их основе. Например, при гидролизе говяжьего мяса с целью получения питательной среды к фаршу говядины добавляют поджелудочную железу в виде фарша или высушенного ферментативного препарата панкреатина. Поджелудочная железа вырабатывает несколько ферментов: трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы. На долю трипсина выпадает до 74% протеазной активности панкреатического сока, на долю химотрипсина 20% и карбоксипептидаз - 6%.

Известны ферменты растительного происхождения, из которых наибольшее применение получили папаин, фицин, бромелайн. Папаин получают из дынного дерева, фицин – из сока плодов фигового дерева, а бромелайн – из зрелых стеблей ананаса.

Растительные ферменты являются очень активными протеолитическими ферментами. Они имеют более низкую специфичность, чем животные ферменты, но способны более глубоко расщеплять белки, как растительного, так и животного происхождения (Л.Я. Телишевская, 2000). Ферменты этой группы считаются перспективными для гидролиза рыбного сырья.

Многие виды микроорганизмов вырабатывают активные протеолитические ферменты. Протеазы микробной природы получают из грибов, актиномицетов, бактерий, бацилл, используя для этой цели культуральную жидкость, мицелий или бактериальную массу. Ферменты, получаемые от микроорганизмов, широко используют в пищевой и легкой промышленности, медицине и сельском хозяйстве. К ферментам микробного и грибного происхождения относят, например, субтилизин, термолизин, каназу, розим и многие другие.

Изучение возможности получения и применения гидролизатов началось в связи с потребностями бактериологии и терапии. Первые шаги по получению и применению гидролизатов в микробиологии были сделаны Робертом Кохом и Леффлером. Эти ученые получали гидролизаты и на их основе готовили питательные среды для культивирования микроорганизмов. В 1913 г. В. Хенрике и А. Андерсен впервые использовали с целью терапии животных внутривенное введение ферментативного гидролизата мяса. В это же время Хоттингер предложил методику изготовления сред из продуктов тритического расщепления белка, которая явилась исключительно важным шагом в развитии микробиологии и не утратила своего значения и на сегодняшний день.

В настоящее время гидролиз белкового материала проводят для решения многочисленных задач человеческой деятельности для получе-

ния пищевых продуктов, расширения ассортимента кормов и улучшения их качества, изготовления пищевых и кормовых добавок, биологических препаратов, питательных сред, для переработки быстро портящегося сырья и т.д.

В медицине и ветеринарии, животноводстве и звероводстве, микробиологии и вирусологии белковые гидролизаты используют для удовлетворения потребностей микро- и макроорганизмов в органических соединениях азота (в первую очередь, аминокислотах и пептидах). В бактериологии гидролизаты, в основном ферментативные, применяют в качестве основ питательных сред или азотсодержащих добавок. В связи с тем, что белковые гидролизаты являются богатым источником аминокислот и пептидов, их используют для лабораторного и промышленного культивирования наиболее прихотливых к питательным средам видов микроорганизмов: молочнокислых, пастереллезных, гемофильных и других.

Гидролизаты успешно используют в вирусологии. Например, гидролизаты из эмбриональных тканей и полученные на их основе питательные среды обеспечивают нормальное развитие и рост клеток почки телят, крольчат, эмбрионов свиней и коров.

Немаловажным назначением гидролизатов для нужд биологической промышленности является применение их в качестве защитных сред при лиофильной сушке биологических препаратов. Наряду с такими веществами, как обезжиренное молоко, сахароза, сывороточный альбумин и другими, пептон и гидролизат желатина способны предохранять клеточный материал от криоповреждений. Кроме этого, гидролизаты используют в составе растворителей некоторых лиофильно высушенных вирусных вакцин (Л.Я. Телишевская, 2000).

К качеству гидролизатов предъявляются определенные требования, зависящие от их назначения. Основным критерием оценки качества гидролизатов, используемых для пищевых целей, является аминокислотный состав, т.е. полноценность в отношении незаменимых аминокислот и их оптимальное соотношение с заменимыми аминокислотами (М.П. Черников, 1975).

В диетологии используют гидролизаты высокой степени очистки, имеющие приятный запах и вкус, не обладающие аллергическим действием. Гидролизаты для парентерального применения должны иметь преимущественное содержание аминокислот и коротких пептидов. В случае перорального применения допускается использование гидролизатов, содержащих более крупные соединения, т.е. поли- и олигопептиды.

Гидролизаты, применяемые для приготовления питательных сред, должны иметь высокую степень очистки, наличие не менее восьми незаменимых аминокислот, а также не менее пяти полунезаменимых (аргинин, гистидин, глутамин, цистин, тирозин).

В остальном, по аминокислотному и пептидному составу гидролизаты, предназначенные для приготовления питательных сред, не имеют строгих ограничений.

Для культивирования большинства производственных штаммов патогенных микробов в качестве amino-кислотно-пептидной основы питательных сред используют гидролизаты средней степени расщепления. Для выращивания прихотливых, требовательных к питательной среде бактерий, среды готовят из гидролизатов высокой степени расщепления (глубокие гидролизаты). Гидролизаты с низкой степенью ферментации белков, содержащие высокомолекулярные пептиды, применяют для приготовления сред, которые предназначены для культивирования токсинообразующих видов с целью синтеза токсинов.

Основным требованием, предъявляемым к гидролизатам, является обеспечение роста микроорганизмов в средах, приготовленных из них.

2.3.2. Получение обычных сред из мяса в лабораторных условиях

К средам мясного происхождения относят мясную воду, мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ), мясо-пептонный агар, мясо-пептонный полужидкий агар (МППЖА).

Исходным материалом для приготовления указанных сред в лабораторных условиях служит мясная вода, которую готовят из говядины или конины. Чаще всего для приготовления мясной воды используют говядину, так как конина является в наше время дефицитным продуктом. Говяжье мясо освобождают от костей, жира, фасций, сухожилий, пропускают через мясорубку, заливают дистиллированной водой в соотношении 1:2, экстрагируют в холодильнике 24 часа, варят 1,5-2 часа, доливая выкипающее количество жидкости водой до первоначального объема, фильтруют, фасуют в пробирки, колбы, закрывают ватно-марлевыми пробками, стерилизуют в автоклаве при 1,5 атм. 30 минут, хранят и используют по назначению.

Мясо-пептонный бульон готовят из мясной воды, к 1 л которой добавляют 1% пептона и 0,5% натрия хлорида. Мясная вода имеет кислую реакцию, поэтому приготовленный бульон подщелачивают 10%-ным раствором едкого калия или натрия гидроксида, кипятят 20-30 минут и проверяют pH с помощью pH-метра любой марки согласно инструкции, прилагаемой к прибору.

В процессе кипячения отмечают уровень бульона и выкипающее количество его доводят до первоначального объема путем добавления дистиллированной воды. Можно сразу добавить 10% воды на выкипание. Для стабилизации pH рекомендуют к бульону добавлять фосфатные буферные смеси, приготовление которых отражают данные таблицы 2, приведенные ниже.

После окончательного установления pH бульон кипятят вторично, но лучше последнее кипячение заменить автоклавированием при 1 атм в течение 30 минут. После кипячения или автоклавирования расфасовывают в бутылки и оставляют для отстаивания. В процессе отстаивания хлоросядаются белки, что обеспечивает прозрачность бульона. По мере не-

обходимости бульон фильтруют через полотняный фильтр или через 3-4 слоя фильтровальной бумаги, расфасовывают по пробиркам и стерилизуют при 1 атм. 30 минут. После стерилизации окончательно устанавливают рН и используют по назначению.

Таблица 2 - Приготовление фосфатной буферной смеси

Соотношение объемов растворов	рН						
	6,47	6,98	7,17	7,38	7,73	8,04	8,34
Na ₂ HPO ₄	3	6	7	8	9	0,5	9,75
KH ₂ PO ₄	7	4	3	2	1	0,5	0,25

Для получения фосфатной смеси готовят 1/15 М растворы фосфата калия однозамещенного и фосфата натрия двузамещенного (выветренного), но следующей пропорции: KH₂PO₄ - 9,078 г на 1 л дистиллированной воды и Na₂HPO₄·2H₂O – 11,876 г также на 1 л воды. В зависимости от требуемого рН, растворы смешивают в определенных объемах, как указано в таблице 2.

В лаборатории МПБ можно готовить из сухих порошков или паст, выпускаемых биопромышленностью. Порошки и пасты поступают в продажу герметически упакованными с указанием их состава и рецепта приготовления питательной среды.

Для приготовления МППБ используют печеночный отвар и МПБ. Печень тщательно промывают, нарезают мелкими кусочками, заливают водой в соотношении 1:1, кипятят 1 час, доливая выкипающую воду до первоначального объема, фильтруют, разливают в колбы и стерилизуют при 1 атм. 40 минут. Затем, отвар смешивают с МПБ в соотношении 1:1 или 1:3, доводят до кипения, добавляют 1,25 г/л натрия хлорида, устанавливают рН 7,5-7,7, кипятят 15 минут, фильтруют, разливают в пробирки и колбы, стерилизуют при 1 атм в автоклаве 40 минут, после чего МППБ считают подготовленным к использованию.

Для получения мясо-пептонного агара в МПБ добавляют 2,5-3% тщательно промытого, мелко нарезанного агар-агара, колбу подогревают на огне до расплавления агара, устанавливают рН, не охлаждая смесь, при необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по пробиркам и автоклавируют при 1 атм. 30 минут. После автоклавирования необходимое количество пробирок скашивают, а затем на застывшую плотную поверхность производят посев патматериала или изучаемой культуры микроорганизмов. Оставшиеся пробирки с нескошенной средой можно хранить и использовать по мере необходимости в течение месяца и более, но во избежание высыхания среды, пробирки плотно закрывают резиновыми пробками.

Мясо-пептонный полужидкий агар готовят по той же методике, что и МПА, с той лишь разницей, что в МПБ добавляют 0,25-0,3% агара.

МППЖА можно готовить непосредственно из мясной воды. Для

этого к мясной воде добавляют 1% пептона, 0,5% двухосновного фосфорнокислого натрия, 0,5% поваренной соли и 0,22-0,25% высококачественного агара (корсаковского) или фирмы «Нобле», «Дифко». Ингредиенты (пептон, соль, агар-агар) необходимо добавлять при обязательном помешивании среды. Кроме указанных ингредиентов, с расчетом на выкипание, добавляют воду. После растворения в среде пептона, соли, агара, 10%-ным раствором NaOH устанавливают рН 7,6-7,8. Раствор едкого натрия надо добавлять постепенно, перемешивая среду. После установления рН среду кипятят 30 минут и переливают из варочного котла в бутыль для отстоя. Затем отстоявшуюся среду фильтруют через плотный слой гигроскопической ваты, лучше через ватно-марлевый фильтр. Профильтрованный полужидкий агар стерилизуют при 115°C в течение 40 минут. Среда после стерилизации должна быть прозрачной и иметь соломенно-желтый, но не коричневый цвет. Среду расфасовывают по пробиркам (стерильным) в условиях стерильного бокса, закрывают ватно-марлевыми пробками и контролируют на стерильность путем выдерживания в термостате в течение 48 часов.

2.3.3. Получение общепотребляемых сред из мяса для производственных нужд

Промышленное производство биопрепаратов для диагностики инфекционных болезней, их профилактики и лечения больных животных диктует необходимость приготовления питательных сред в больших объемах. Поэтому питательные среды для производственных нужд готовят в специальных реакторах – сосудах большой емкости (500-1000 л), которые оборудованы электронагревательными приборами, механической мешалкой, терморегуляторами.

В биологической промышленности для культивирования большинства патогенных микроорганизмов бактериальной природы служит бульон Хоттингера, приготовленный из основного перевара Хоттингера.

Для приготовления перевара используют фарш из мяса крупного рогатого скота, освобожденного от костей, жировой клетчатки, связок и сухожилий. Мясо необходимо брать свежее, но остывшее на протяжении суток после убоя животных. Не рекомендуют брать мясо очень старых животных, так как среды, полученные из него, плохо фильтруются и дают большой осадок после стерилизации. На 1 кг фарша добавляют 1,5 литра дистиллированной или водопроводной воды, подогретой до температуры 40-42°C, тщательно перемешивают, смесь подщелачивают химически чистыми двууглекислой содой (ГОСТ 2156-76) или 10%-ным раствором едкого натрия гидроокиси (ГОСТ 4328-77) до рН 7,8-8,0. На 1 литр смеси добавляют 150-200 г очищенной от оболочек и измельченной на мясорубке поджелудочной железы крупного рогатого скота или 20-30 г панкреатина и 80 см³ химически чистого хлороформа.

После добавления ингредиентов, смесь перемешивают и оставляют для переваривания при температуре 40-42°C в течение 4-5 суток.

Первые шесть часов смесь перемешивают каждый час, а затем - 3-4 раза в сутки. В процессе переваривания ежедневно определяют рН и в случае снижения концентрации водородных ионов перевар подщелачивают до 7,8-8,0 добавлением 10%-ного раствора едкого натрия гидроксида. После истечения срока переваривания фарш превращается в рыхлый сероватый осадок, над которым при правильном переваривании верхний слой жидкости имеет соломенно-желтый цвет.

Падение процентного содержания триптофана, начиная с 350-300 мг%, свидетельствует о готовности перевара. К этому времени рН стабилизируется в пределах 7,8-8,0.

Химические показатели качественного перевара:

- общего азота – 800-1200 мг%;
- аминного азота – 600-900 мг%;
- триптофана – 100-200 мг%.

При необходимости перевар Хоттингера можно хранить до одного месяца при 18°C, для чего к нему добавляют хлороформ из расчета 10 см³ на 1 литр перевара.

Бульон Хоттингера готовят из прозрачной жидкости основного перевара, которую разводят дистиллированной или водопроводной водой до содержания в бульоне 280-300 мг% аминного азота и добавляют 0,2-0,5% пептона (ГОСТ 13805-76), 0,5% поваренной соли (ГОСТ 4238-77), 0,3% химически чистого двуосновного фосфорнокислого натрия (ГОСТ 11773-76) и 10% воды на выкипание. Среду кипятят в течение 30 минут. В процессе кипячения устанавливают рН 7,8-8,0, добавляя 10%-ный раствор едкого калия или натрия гидроксида, затем снова кипятят 1 час и оставляют в том же варочном котле для остывания на 1-2 часа. Затем среду фильтруют до полной прозрачности через плотный слой ваты и марли или же через пластины Зейтца марки «Ф». После фильтрации среду перекачивают в другой заранее подготовленный стерильный реактор, стерилизуют при 120-180°C в течение 45-50 минут, рН готовой среды - 7,4-7,6.

Оптимальное значение рН питательных сред зависит от вида культивируемых микроорганизмов и устанавливается экспериментатором.

Приготовление мясо-пептонного бульона из переваров Хоттингера является более экономичным, чем приготовление его из мясной воды, т.к. из одного и того же количества мяса получают в 5-10 раз больше бульона. К тому же присутствие в переварах значительного количества аминокислот создает буферность, а следовательно, и большую стабильность рН среды.

Необходимо отметить, что окончание процесса переваривания мяса по Хоттингеру характеризуется следующими признаками:

- на дне бутылки образуется пылевидный осадок;
- жидкость над осадком просветляется и принимает соломенно-желтый цвет;
- перевар легко фильтруется;
- реакция на триптофан с бромной водой положительная, т.е. при

добавлении в пробирку с 3-4 см³ фильтрованного перевара 3-4 капель бромной воды жидкость приобретает розово-фиолетовый цвет.

Важным компонентом мясных гидролизатных сред является пептон. Для его приготовления свиные желудки тщательно очищают от жира и пленок, а затем пропускают через мясорубку. Полученный фарш закладывают в емкость (бутыль, реактор) из расчета: 250 г фарша на 1 литр дистиллированной воды и подогревают до 50°С, добавляют соляной кислоты (удельный вес 1,19) 10 см³ и проверяют рН, значение которого должно быть не ниже 2,0. Смесь помещают в термостат на переваривание, которое ведут при 50°С в течение 24 часов. Полученный пептон прогревают при 100°С в течение 30 минут, фильтруют через гигроскопическую вату и подщелачивают 10%-ным раствором NaOH до щелочной реакции. После этого пептон фильтруют через бумажный фильтр, расфасовывают в колбы и стерилизуют в автоклаве при 115°С в течение 30 минут.

В РБ пептон микробиологический для бактериальных питательных сред не готовят. В России «Пептон микробиологический» производства ОАО «Мясокомбинат Раменский» разработан как аналог «Пептона ферментативного» по ГОСТ 13805. В качестве сырья для производства этого пептона использовали отходы медицинской (эндокринной), биологической промышленности и мясокомбинатов.

Значимую работу по изучению пептона производства ОАО «Мясокомбинат Раменский» провели З.Ф. Богаутдинов, Л.Я. Телишевская, Е.С. Вылегжанина, Е.А. Тимошкина и А.А. Алешин (2001).

Для характеристики пептона по химическому составу и физико-химическим свойствам в ТУ включены следующие показатели: содержание влаги, золы, нерастворимых примесей, общего и аминного азота, значение рН 1%-ного раствора. Авторы при испытании ростообеспечивающей способности пептона в составе питательных сред проводили опыты с пятью тест-штаммами, общепринятыми при контроле ростовой способности сред: *Staphylococcus aureus* штамм Лоссманов, *Escherichia coli* шт. 675, *Enterococcus faecalis* 6783, *Shigella flexneri* 1Q 8516, *Corynebacterium xerosis* 1911.

Питательные среды готовили на основе мясной воды и вносили в их испытуемый пептон и хлорид натрия в количестве 1%. Коррекцию рН среды проводили, учитывая оптимальное значение показателя, для культивируемых микроорганизмов (7,0-7,4). Среду кипятили, расфасовывали в пробирки, закрывали ватно-марлевыми пробками и стерилизовали при 120°С в течение одного часа.

В качестве контрольных сред экспериментаторы использовали МПБ на основе той же мясной воды с добавлением пептона Семипалатинского мясокомбината (контроль № 1) и фирмы Дифко (контроль №2).

Исследователи провели оценку интенсивности роста бактериальных культур, типичности морфологии бактерий, изучили характер роста микробов на жидких и плотных питательных средах. Помимо этого, они

апробировали возможность использования испытуемого пептона в составе сред Гисса, применяемых при изучении биохимических свойств бактерий.

В результате опытной работы установлено, что «Пептон микробиологический», предложенный в качестве пептидного компонента для питательных сред, представляет собой сухой сыпучий порошок от бежевого до кремового цвета, имеющий специфический запах белкового гидролизата. Он хорошо растворяется в воде с образованием прозрачного или же слегка мутного раствора, который легко осветляется путем фильтрации.

Физико-химические свойства экспериментальных серий пептона отвечали требованиям ГОСТа 13805 «Пептон ферментативный».

Пептон опытных серий в составе питательных сред обеспечивал рост микроорганизмов, не уступающий по интенсивности их росту в контрольных средах. Бактериальные клетки по морфологии и тинкториальным свойствам были типичными. В средах Гисса с испытуемым пептоном тест-штаммы микроорганизмов вызывали ферментацию углеводов, типичную для засеянных бактерий. Характер роста на жидких и плотных питательных средах был визуально оценен авторами как типичный. Проведенная опытная работа позволила авторам рекомендовать пептон производства ОАО «Мясокомбинат Раменский» использовать в составе питательных сред наравне с пептоном других производителей, как для культивирования микроорганизмов, так и для изучения биохимических свойств с диагностической целью.

Интересная работа по получению комбинированного пептона из непищевых белков животного и растительного происхождения была проведена на Грузинском биокомбинате Н.И. Таварткиладзе, Ц.А. Ментанашвили, З.А. Агаповой (1980). Они приготовили пептон из тунгового жмыха (отход маслоэкстрактивного производства) и отхода сывороточного производства – фибрина. Полученный после высушивания комбинированный пептон имел показатели качества, которые укладывались в требования, предъявляемые к бактопептонам. Комбинированный пептон из тунгового жмыха и фибрина в соотношении 1:1 имел следующие показатели качества: значение рН - 6,8-7,2, содержание полипептидов - 80-92%, общего азота - 12-13%, аминокислотного азота - 4-4,3%, триптофана - 1,2-1,7%, содержание хлоридов составило 0,07-0,4%, влаги - 4-5,9% и золы - 7-7,6%.

Авторы считают, что использование фибрина и тунгового жмыха в качестве сырья для получения пептона является перспективным и экономически выгодным.

В современном производстве биологических препаратов достаточно остро стоит проблема механизации и автоматизации технологических процессов, в том числе и механизации приготовления питательных сред.

На Сумской биофабрике В.А. Рахмановым была разработана и эксплуатируется механизированная установка для составления и подготовки

сред на основе перевара Хоттингера и подачи их в производственные цеха.

Установка (рис. 2) состоит из реакторов 1 и 2 емкостью 630 л каждый с перемешивающим устройством рамного типа, фильтров 3 и 4 с тканевой и ватно-марлевой фильтрующей перегородкой, систем трубопроводов различного назначения и контрольно-измерительных приборов. К реакторам подведены коммуникации сжатого воздуха 13, вакуума 12 и деминерализованной воды 10. Воздушшкой 11 реакторы связаны с атмосферой.

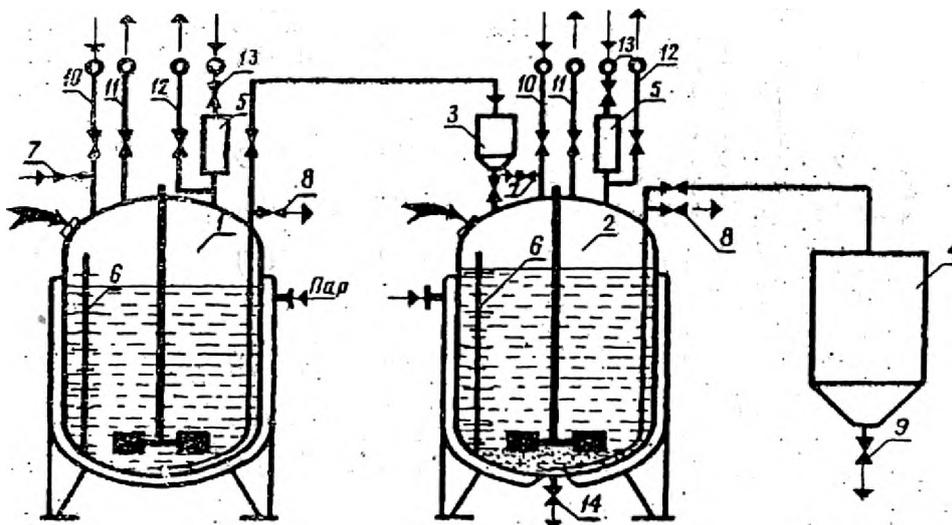


Рисунок 2 - Установка для изготовления под давлением питательных сред из ферментативных переваров

Порядок работы установки следующий. С помощью вакуума в реактор 1 через штуцер 7 загружается расчетное количество перевара Хоттингера и тритического перевара казеина, добавляется деминерализованная вода, дозирование которой производится с помощью мерной линейки 6. Смесь подогревается до температуры 60°C , а затем добавляется пептон и соляная кислота. После перемешивания температуру в реакторе доводят до $107-110^{\circ}\text{C}$, выдерживают смесь при этой температуре в течение 30 минут, а затем содержимое реактора 1 перекачивают в реактор 2, профильтровав через 2-3 слоя бязи на фильтре 3. Реакцию фильтрата устанавливают в пределах 7,6-7,8, добавляют к нему необходимое количество двухосновного фосфорнокислого натрия, одноосновного фосфорнокислого калия, химически чистой поваренной соли и желатина, после чего при температуре $95-98^{\circ}\text{C}$ устанавливают рН 8,0-8,2 - 4%-ным раствором химически чистого едкого натра. Затем закрывают люк и температуру среды доводят до $107-110^{\circ}\text{C}$. После шестидесятиминутной выдержки при периодическом перемешивании среду фильтруют через ватно-марлевую перегородку, размещенную в фильтре 4 и по трубопроводу подают в производственный цех-потребитель.

Краны 8 служат для взятия проб при промежуточных анализах. Раздаточные трубопроводы 9 до и после подачи среды в цех-потребитель промывают водой и стерилизуют паром.

При изготовлении полужидких питательных сред из мясо-пептонного бульона в реактор 2 загружается нерасплавленный агар-агар, двухосновной фосфорнокислый натрий и мясо-пептонный бульон. Смесь подогревают, постоянно перемешивая, до 95-96°С, двууглекислой содой или 4%-ным раствором NaOH устанавливают рН 7,6-7,8, затем температуру среды доводят до 110°С и выдерживают в течение 30 минут. После этого среду можно подавать в цеха-потребители.

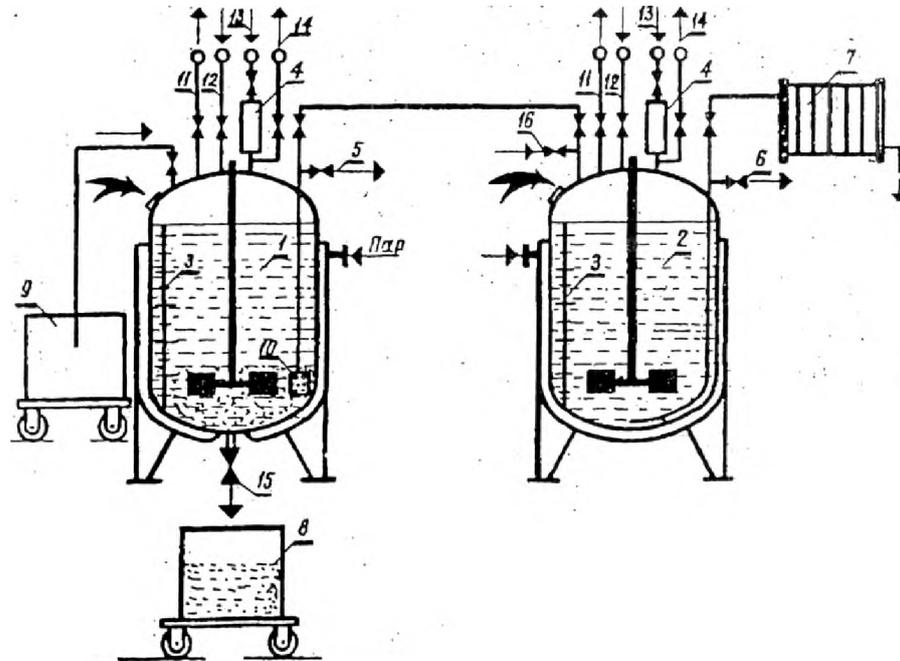


Рисунок 3 - Установка для изготовления мясо-пептонного бульона

На рисунке 3 показана установка для изготовления мясо-пептонного бульона. Расчетное количество фарша из говяжьего мяса, поступающего из мясо-сырьевого (подготовительного) цеха в емкости 9, установленной на тележке, разбавляют деминерализованной водой до текучего состояния и с помощью вакуума по трубопроводу загружают в реактор 1, затем добавляют соль и недостающее количество деминерализованной воды. Смесь нагревают до 107-110°С и, периодически перемешивая, выдерживают при этой температуре в течение 40-50 минут. Мясной настой по трубе подают в реактор 2, куда добавляют пептон и деминерализованную воду и выдерживают при 107-110°С в течение 20-30 минут.

Мясо-пептонный бульон, готовый к использованию, фильтруют на фильтре 7 и по трубопроводу подают в цеха-потребители. С целью исключения попадания фарша в мясной настой на нижнем конце трубы реактора 1 установлен перфорированный заборный патрубок 10, который закрыт двойным слоем капронового сита № 30. Реактор оборудован нижним выпуском 15, предназначенным для выгрузки использованного фарша. Сжатым воздухом он выдавливается в контейнер 8, в котором и поступает в цех утилизации отходов.

Штуцер 5 предназначен для выгрузки в стеклянные бутылки мясного

настоя, который стерилизуют в паровых автоклавах и используют при изготовлении питательных сред, а штуцер б – для отбора проб при промежуточных анализах мясо-пептонного бульона.

Использование установок для изготовления питательных сред позволяет свести до минимума трудоемкие ручные операции аппаратчиков-средоваров и насыщение воздуха производственных помещений водяными парами.

2.3.4. Питательные среды из сырья различного происхождения

В настоящее время заслуживают внимания три основных пути оптимизации и совершенствования питательных сред. К первому относят внесение в среды различных питательных добавок и стимуляторов роста выращиваемых микроорганизмов. Второй путь связывают с поиском источников нового сырья, богатого белками для приготовления питательных основ, среди которых особое место отводят белковым гидролизатам. По мнению Г.П. Трошкова и др.(2006), в последнее время ведутся исследования, связанные с возможностью использования белковых гидролизатов из отходов мясной, молочной, рыбной, птицеперерабатывающей промышленности. Третий путь – это разработка способов повышения качества сырья, используемого для приготовления микробиологических сред, направленных на увеличение в нем биологически активных компонентов. Приготовление качественных питательных сред из природного сырья имеет определенные трудности, что объясняется, прежде всего, снижением качества самого сырья, в частности, мяса и растительных объектов, в связи со сложной экологической обстановкой и антропогенным воздействием на окружающую среду. В сырье могут содержаться антибиотики, химикаты, токсические продукты, что негативно отражается на процессе культивирования и приросте биомассы микроорганизмов в средах, приготовленных из такого сырья.

Перспективным сырьем для приготовления белковых основ питательных сред является биомасса дрожжей. Экстракты и гидролизаты из дрожжей применяли в составе питательных сред как пептидные и витаминные добавки, а после глубокого автолиза или гидролиза – в качестве белковых основ питательных сред для культивирования различных видов микроорганизмов, о чем свидетельствуют работы В.И. Бобрышева с соавторами (1980), В.Н. Милютина с соавторами (1982), Б.М. Раскина (1985), М.В. Антонычевой (2012), З.З. Султанова (2008). Различают кормовые, пекарские и пивные дрожжи. По своему составу наиболее близки к мясу говядины пекарские дрожжи, содержащие до 52-56% протеинов. Ю.А. Козлов (1950), М.О. Биргер (1982), З.З. Султанов (2009) считают, что автолизат пекарских дрожжей по физико-химическому составу близок к триптическому перевару по Хоттингеру.

В связи с отмеченным полагаем уместным привести общую характеристику дрожжей, строение дрожжевой клетки, ее химический состав,

способы наращивания биомассы этих микроорганизмов.

Дрожжи – безмицелиальные, не образующие хлорофилла одноклеточные грибы. Дрожжевые клетки бывают яйцевидной, эллипсоидальной, овальной или палочковидной формы, величиной 5-7х8-11 мкм, удлинённые формы могут быть величиной 20 мкм и более. Дрожжи являются гетеротрофами с окислительным или бродильным типом метаболизма. Наиболее распространённым способом размножения дрожжей является почкование, реже они размножаются делением. Описан и половой способ размножения. При половом размножении после слияния ядер двух клеток зигота превращается в аску, диплоидное ядро делится 2-3 раза и образуются 4 или 8, а иногда 12 аскоспор. Каждая аскоспора может прорасти в новую вегетативную клетку. Пекарские дрожжи относят к семейству *Saccharomycetaceae*, роду *Saccharomyces*, виду *S. cerevisiae*. В природе дрожжи находятся в почве, на поверхности растений, плодов, ягод.

Строение дрожжевой клетки аналогично строению эукариотических клеток, т.е. она имеет клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, цитоплазму, ядро, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии, рибосомы, вакуоли.

Средний элементарный химический состав дрожжевых клеток характеризуется следующими данными (в процентах) по Е.А. Скиба (2010):

- углерода – 47;
- водорода – 6,5;
- кислорода – 31;
- азота – 7,5-10;
- фосфора – 1,6-3,5;
- кальция – 0,3-0,8;
- калия – 1,5-2,5;
- магния – 0,1-0,4;
- серы – 0,2.

В дрожжах содержатся такие микроэлементы, как железо, медь, цинк, молибден. Прессованные дрожжи содержат 25-28% сухих веществ и 72-75% воды. Сухие вещества представлены следующими компонентами (в процентах):

- белок – 37-50;
- общий азот – 6-8;
- безазотистые вещества – 35-45;
- жир – 1,5-2,5;
- зола – 6-10.

Дрожжевые клетки богаты витаминами, особенно группы В, и эргостерином - провитамином Д. Они содержат:

- витамин В₁ – тиамин, аневрин;
- витамин В₂ – рибофлавин;
- витамин В₃ – пантатеновая кислота;
- витамин В₅-РР – никотиновая кислота;
- витамин В₆ – пиридоксин;

- витамин В₈ – инозит;
- витамин Н – биотин;
- парааминобензойную кислоту.

В состав дрожжей входит смесь истинных жиров (глицеридов жирных кислот) с фосфолипидами (лецитин, кефалин) и стеролами (эргостерол). В основном, жир дрожжей состоит из насыщенных кислот жирного ряда: олеиновой, линоленовой, пальмитиновой и стеариновой. В дрожжах содержатся углеводы в количестве от 35 до 45%, которые представлены главным образом полисахаридами (гликоген, маннан, глюкан) и входит в состав протоплазмы и клеточной оболочки. Глюкан, маннан, трегалозу, гликоген считают нормальными компонентами дрожжевой клетки. Дисахарид трегалоза является значимым источником энергии в клетке. Дрожжи содержат фосфор, серу, калий, железо, кальций, магний, марганец. Фосфор находится в молекулах нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов. Сера входит в состав аминокислот, витаминов, ферментов. Калий необходим клетке как питательный элемент и стимулятор ее размножения. Железо находится в составе цитохромов, пероксидазы, каталазы и других ферментов, участвующих в процессе дыхания. Магний и марганец ускоряют потребление клеткой глюкозы. Многие микроэлементы в составе ферментов, витаминов и других соединений влияют на скорость и характер различных биохимических процессов.

При выращивании хлебопекарских дрожжей готовят питательную среду, обеспечивающую быстрый рост и размножение дрожжевых клеток. Основным сырьем в производстве пекарских дрожжей служит меласса, которую используют во всем мире для получения питательной среды для этих бактерий. Однако, в качестве сырья могут быть использованы крахмальные материалы после их гидролиза бактериальными или грибными амилазами. Перспективным сырьем считают целлюлозу, а также депротенизирующую молочную сыворотку.

На жизнедеятельность дрожжевых клеток оказывают влияние следующие факторы:

- состав питательной среды;
- концентрация действующих веществ;
- рН среды;
- температура и аэрация среды.

Питательная среда должна содержать все необходимые вещества для роста и размножения дрожжей. По мнению Е.А. Скиба (2010), скорость роста дрожжей обуславливается осмотическим давлением водорастворимых веществ среды и концентрацией клеточного сока дрожжей. Исследователь считает, что осмотическое давление внешней среды должно быть ниже, чем осмотическое давление клеточного сока, что способствует усвоению питательных веществ дрожжевой клеткой.

Чем больше разница в величине осмотического давления в клетке и среде, тем быстрее накапливается биомасса дрожжей. Оптимальное значение рН питательной среды для размножения дрожжей составляет от 4,5

до 5,5. Дрожжи относятся к мезофильным микроорганизмам, температурный оптимум для них составляет 20-30°C. Аэрация среды способствует непрерывному снабжению клеток кислородом, удалению образующегося углекислого газа, доставке питательных веществ к клеткам, поддержанию бактерий во взвешенном состоянии.

При выращивании дрожжей по воздушноприточному способу различают три периода:

- I период – разбраживание дрожжей (1 ч);
- II период – накопление дрожжевой массы (7-14 ч);
- III период – дозревание дрожжей (0,5-1,5 ч).

В первом периоде дрожжи переводятся из состояния покоя в состояние почкования. В это время перестраивается ферментативный комплекс клетки. К концу периода разбраживания идет формирование молодых почек дрожжей. Под микроскопом можно заметить выпячивание протоплазмы или молодые почки размером 1-2 мкм.

Во втором периоде начинается собственно рост дрожжевой клетки. При этом количество почкующихся клеток растет. Интенсивность накопления биомассы характеризуется скоростью роста и размножения дрожжевых клеток.

По мнению М.В. Антонычевой (212), А.Б. Мазруко (2016), аутолизаты и экстракты дрожжей давно заняли видное место в изготовлении питательных сред. Классический способ получения аутолизата пекарских дрожжей при воздействии внутриклеточных протеаз – прогревание суспензии клеток при 60°C в течение 2 суток. Полученный таким способом аутолизат дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* представляет собой препарат 45-55%-ного расщепления белка, содержащий 250-300 мг% общего азота и 75-150 мг % - аминного. Получаемые продукты гидролиза имеют характер смесей органических веществ, и требуются дополнительные манипуляции (осветление, очистка), чтобы выделить наиболее важный компонент. Одним из приемов выделения действующего начала является экстракция. Экстракты широко используют как источник витаминов и аминокислот в изготовлении питательных сред для прихотливых бактерий.

М.В. Антонычева (2012) на основе аутолизата пекарских дрожжей разработала плотные и жидкие питательные среды для выращивания чумного микроба. По ее данным предложенные среды на основе гидролизата пекарских дрожжей, по биологическим показателям соответствуют требованиям, предъявляемым к средам для культивирования чумного микроба.

Для производства микробного белка М.Ю. Кабулова использовала дрожжи местной селекции и питательную среду из растительной массы горца сахалинского. Автор изучала химический состав зеленой массы горца сахалинского в зависимости от фаз развития растения, которая содержит в своем составе, в среднем: сухого вещества - 23,24%, протеина - 1,85%, жира - 0,98%, клетчатки - 8,5%, золы - 1,27%, БЭВ - 10,64%. Она

рекомендовала готовить питательную среду из упомянутого растения и применять ее для производства микробного белка.

3.3. Султанов (2008) разработал технологию получения панкреатических гидролизатов из минтая, хека, путассу и ставриды. Гидролизаты из этих видов рыб по содержанию общего, аминного азота, пептонов и по аминокислотному составу оказались пригодными для приготовления питательных сред, предназначенных для культивирования многих видов микроорганизмов.

Н.Н. Ткаченко (2009) считает, что полноценность гидролизата зависит от качества используемого сырья, которое должно содержать максимальное количество полноценного белка, витаминов, микро- и макроэлементов, быть экологически чистым и безвредным, легко воспроизводимым, доступным, обеспечивать экономическую эффективность применения. С учетом этих требований она использовала для приготовления питательных сред калифорнийских червей и молоки лососевых рыб. Биомасса калифорнийских червей значительно превосходит мясное сырье по содержанию протеина (от 68 до 82%) и не уступает ему по количеству незаменимых аминокислот, витаминов, микро- и макроэлементов. Молоки лососевых рыб содержат до 16,3% белка, в большом количестве - фосфор, натрий, магний, калий, железо, витамины – В₁, В₂, В₁₂, РР, С, жирные кислоты омега-3, протамины. Питательные среды, приготовленные на основе гидролизатов калифорнийских червей и молок лососевых рыб, обеспечивали рост всех тест-штаммов микроорганизмов и многих других видов бактерий.

Н.И. Пенькова выявила необходимость изыскания новых доступных и экономически оправданных компонентов, использование которых позволит усовершенствовать имеющиеся и разработать новые эффективные питательные среды для молочнокислых бактерий. Автор установила возможность использования тибетского молочного гриба и каллизии душистой для приготовления питательных сред и культивирования на них лактобактерий. Действительно, в тибетском молочном грибе (настой) содержатся витамины (В₁, В₂, В₁₂, РР, А, Д), лизин солянокислый, пролин, валин, треонин, фенилаланин, калий, кальций, железо, йод, цинк, фолиевая кислота, ферменты, кислоты, белки, полисахариды, т.е. состав гриба соответствует потребностям молочнокислых бактерий.

Растительное сырье редко используют при приготовлении питательных сред для культивирования молочнокислых бактерий. Однако важным преимуществом питательных сред из растительного сырья является их экономичность. Каллизия душистая имеет уникальный состав. В этом растении обнаружены: каротиноиды, аскорбиновая кислота, флавоноиды, пектины, эфирные масла, витамины (В₂, В₁₅, РР) макро- и микроэлементы (калий, кальций, железо, марганец, никель, медь, цинк, бром и многие другие).

Для каждого вида упомянутого сырья были подобраны оптимальные способы гидролиза и на основе гидролизатов получены питательные

среды, пригодные для выращивания лактобактерий.

Большую и интересную экспериментальную работу в научном и практическом отношении выполнил А.П. Шепелин (2013). Им при приготовлении питательных сред для различных микроорганизмов использовано непищевое сырье – рыбная мука. Автором впервые показано, что панкреатический гидролизат рыбной муки является в физиологическом и химическом отношении полноценным препаратом для конструирования бактериологических питательных сред. Аминокислотный состав и другие важные для роста и размножения бактерий показатели гидролизата находятся на уровне таких питательных основ, как пептон ферментативный и ферментативные гидролизаты мяса, которое является ценным пищевым продуктом. Действительно, в своем составе гидролизат содержит 3,5% аминного азота, 10% общего азота, 18% свободных аминокислот, 20% хлористого натрия.

Исследователь определил состав кормовой рыбной муки и сравнил полученные данные с литературными, что отражает цифровой материал таблицы 3.

Из таблицы следует, что рыбная мука по содержанию протеина, жира, аминокислот, макро- и микроэлементов является сырьем, потенциально пригодным для приготовления питательных сред для бактерий.

А.П. Шепелиным обоснована возможность использования панкреатического гидролизата рыбной муки как основы питательных сред для культивирования широкого спектра микроорганизмов, что позволило исследователю предложить технологию производства 40 наименований питательных сред, 37 из которых прошли все этапы государственной регистрации. Одним из важных направлений исследований в бывшем СССР была разработка белковых гидролизатов и приготовление на их основе питательных сред для микроорганизмов.

В 40-50-е годы опытной работой в области гидролиза белков занимались видные ученые М.А. Бабич, Д.А. Цуверкалов и А.Х. Саркисов.

В последующие годы разработка гидролиза белков была связана с необходимостью утилизации белковых отходов различных производств и замене для получения питательных сред ценного пищевого продукта мяса непищевым сырьем.

Особенно интенсивно велись исследования по получению гидролизатов из непищевого сырья и приготовлению на основе их питательных сред для культивирования микроорганизмов в 70-80-е годы 20-го столетия.

Таблица 3 - Состав кормовой рыбной муки

Показатель	Данные литературы	Авторские данные
1	2	3
Сырой протеин, %	60-66	60-75
Жир, %	3,4-9,7	6,0-14,0
Влага, %	6,2-9,3	4,0-12,0
Зола, %	10,0-20,0	14,0-19,0

Продолжение таблицы 3

1	2	3
Аминокислоты, г/100 г белка		
Аспарагиновая кислота	9,15±0,31	10,98±0,45
Треонин	4,19±0,2	4,96±0,21
Серин	4,08±0,37	5,48±0,33
Глутаминовая кислота	12,68±0,35	14,58±1,64
Пролин	4,70±0,51	4,60±1,02
Глицин	7,23±1,44	6,74±1,23
Аланин	6,29±0,24	6,56±0,45
Валин	5,17±0,33	4,98±0,96
Метионин	2,78±0,11	3,30±0,21
Изолейцин	4,37±0,31	4,18±0,46
Лейцин	7,21±0,36	8,34±0,27
Тирозин	3,16±0,26	3,60±0,06
Фенилаланин	3,90±0,29	4,26±0,34
Лизин	7,53±0,34	7,32±0,83
Гистидин	2,60±0,47	3,16±0,69
Аргинин	6,07±0,24	7,52±0,64
Макроэлементы, %:		
Кальций	4,79±2,20	4,81±1,07
Фосфор	2,97±1,19	Не определяли
Натрий	0,54±0,23	0,83±0,02
Магний	0,16±0,05	0,14±0,02
Калий	0,87±0,21	0,53±0,08
Микроэлементы, мг%		
Железо, мг%	28,0±10,0	22,0±9,0
Медь, мг%	0,96±0,24	1,6±1,9
Цинк	12,0±1,9	6,3
Марганец	1,44±1,25	0,5

Н.А. Ашкибаевым, Г.И. Николаевой и др. (1978) были проведены на Алма-атинском биокомбинате исследования по гидролитическому расщеплению белков вареной печени – отхода при приготовлении печеночного экстракта. Авторами был разработан технологический режим гидролиза вареной печени, изучены физико-химические показатели полученных гидролизатов (содержание пептонов, аминокислот, общего и аминного азота и др.) и доказана возможность использования их в качестве источника питания при культивировании клостридий. Экспериментаторы проводили гидролиз вареной печени в реакторах емкостью 630 л. Водопроводную воду в реакторе нагревали до температуры 42-45°C, вносили фарш вареной печени, поджелудочной железы и хлороформ. Гидролиз вели при pH 7,4-7,6 в течение 2,5-3 ч. до содержания аминного азота в пределах 320-350 мг%.

Полученный гидролизат был прозрачным, соломенно-желтого цвета, приятного запаха, значение рН было в пределах 4,2-4,5. Содержание общего азота – 570-762 мг%, аминного – 320-350 мг%, пептона – 6-9%. В нем были обнаружены аспарагиновая кислота, треонин, серин, пролин, цистин, метионин, лейцин, тирозин и др. аминокислоты.

Исследователями в результате многочисленных опытов была сконструирована питательная среда следующего состава: перевар Хоттингера – 15%, печеночного экстракта – 14,7%, гидролизата вареной печени – 10%, поваренной соли – 0,5%, воды – до 100 л (60%). Сконструированная среда была применена для культивирования производственных штаммов *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* и *Cl. septicum*. Накопление клостридий не уступало накоплению их в питательной среде, приготовленной из высокосортового мяса. Из бакмассы, выращенной на питательной экспериментальной среде, были приготовлены противоклостридиозные вакцины, которые по иммуногенной активности не уступали препаратам, приготовленным на питательной среде, полученной из мяса, пригодного в пищу людям. Естественно, что даже частичная замена мясного гидролизата таковым из вареной печени позволяет снизить себестоимость вакцин, что является экономически оправданным.

Оригинальную работу по повторному использованию питательной среды (фугата) выполнила на Ставропольской биофабрике О.П. Косикова (1979). Она доказала, что после 18-часового культивирования листерий при изготовлении сухой живой противолистерииозной вакцины значительная часть питательных веществ в среде остается неиспользованной. Поэтому, О.П. Косикова на основе фугата изготовила несколько вариантов питательной среды для культивирования листерий. Лучшие результаты при выращивании бактерий были получены при соотношении 80% фугата и 20% свежеприготовленного бульона Хоттингера. На предложенной среде было приготовлено 6 опытных серий вакцины. Все серии по качеству отвечали требованиям нормативно-технической документации.

В.А. Рахманов, В.В. Доценко, В.И. Шестаков, В.И. Евдокименко и др. (1979) использовали гидролизаты из куриных эмбрионов, аллантоисная жидкость которых извлекается, а остальная часть их является отходами и утилизируется. Поэтому, авторы после извлечения аллантоисной жидкости измельчали эмбрионы на коллоидной мельнице или мясорубке вместе со скорлупой. Через 30-40 минут скорлупа осаждалась, после чего надосадочный белковый субстрат перекачивался в ферментер. Затем на 1 кг субстрата добавляли 100 г говяжьей печени, 150-200 г, измельченной поджелудочной железы, 1-1,5 л воды, рН смеси доводили до 7,6-7,8 4%-ным раствором NaOH. На каждый литр смеси добавляли 10 см³ химически чистого хлороформа. Гидролиз вели при перемешивании смеси через каждый час в течение 6-7 суток при температуре 40-42°C. Было приготовлено три серии гидролизата, которые имели следующие биохимические показатели:

- аминный азот – 730-800 мг%;
- общий азот – 1066-1300 мг%;
- триптофан – 295-300 мг%;
- рН – 7,05 - 7,15.

На основе полученных гидролизатов, авторы приготовили питательную среду, в состав которой включили: эмбриональный гидролизат до 150-170 мг%, аминный азот, пептон – 0,5%, Na₂HPO₄ – 0,5%, агар – 0,2%, сахарозу – 0,2%, NaCl – 0,3%, HCl – 1 г/л, общий азот – 390-420 мг%, триптофан – 50-80 мг%.

На приготовленной питательной среде выращивали рожистые палочки. Из бакмассы возбудителя рожи было приготовлено 10 экспериментальных серий вакцины против рожи свиней, которые прошли биологический контроль и были признаны годными для практического применения.

М.Е. Ефимова, Е.Э. Школьников, Э.Ф. Токарик, В.Н. Егорова (1981) изучили ростовые свойства питательных сред на основе ферментативного казеиново-дрожжевого гидролизата и доказали, что питательные среды, приготовленные на основе упомянутого гидролизата, не уступают по ростовым свойствам средам, полученным из перевара Хоттингера. Авторы обоснованно рекомендуют применять эти среды для культивирования энтеробактерий.

Сотрудники ВНИИВВиМ В.А. Балабанов и И.А. Бакулов (1981) предложили для выращивания возбудителя дерматофилеза *Dermatophilus congolensis* мальтозо-пептонную среду. Они доказали, что данный возбудитель может расти на средах, лишенных белков сыворотки крови и даже не содержащих гидролизата мышечных или растительных белков. Бакмасса возбудителя была успешно применена для изготовления специфического диагностикума.

В процессе производства вакцины против пастереллеза птиц для выращивания бактерий используют питательную среду, приготовленную на основе перевара Хоттингера, который готовят из говяжьего мяса. С целью замены говяжьего мяса А.С. Хуршудянц, Ю.А. Тамбовцев, Л.Г. Блохина и др. (1981) провели гидролиз фибрина, который является отходом сывороточного производства. Они доказали, что замена 50% мясного фарша на фибрин не влияет на длительность гидролиза и качество гидролизата. Полученный гидролизат авторы использовали для приготовления питательной среды и последующего культивирования в ней пастерелл. Было установлено, что накопление пастерелл в экспериментальной и питательной производственной среде (бульон Хоттингера) было одинаковым, т.е. урожайность бактериальной массы составила в среднем 3,4-3,5 г с одного литра сред. Замена 50% мясного фарша на фибрин позволяет сэкономить пищевой продукт – мясо – и получить более дешевые качественные питательные среды.

Т.Е. Яковлев, Е.Г. Лавченко, А.Д. Чудина и др. (1983) сообщают об успешном использовании бараньего мяса, которое являлось отходом производства мозговой антирабической вакцины. Баранье мясо в виде фарша обрабатывали в коллоидной мельнице и получали гомогенизат. Гидролиз гомогенизата проводили в течение 5-6 суток при 42-43°C. На основе полученного гидролизата были приготовлены полноценные питательные

среды для культивирования бактерий рожи свиней (штамм ВР-2).

Известно, что пептон является важным компонентом питательных сред. Учитывая это, Л.Я. Телишевская, С.Н. Цыганкова, А.В. Зинченко, А.Ф. Ткачев, В.Г. Волощук (1984) показали возможность использования отходов производства медицинского препарата АТФ – жмыха мышечной ткани крупного рогатого скота для изготовления сухого ферментативного пептона. Ими разработана технологическая схема производства препарата. Пептон, приготовленный по этой схеме, при включении его в состав питательных сред обеспечивает рост микроорганизмов, аналогичный росту их в средах с добавлением препарата, изготовленного по утвержденной производственной инструкции.

Л.Я. Телишевская, А.В. Зинченко, С.Н. Цыганкова, А.Ф. Ткачев и Е.А. Лысенко (1984) провели экспериментальную работу по получению гидролизатов для приготовления питательных сред из отходов производства пищевого пепсина (жмых слизистой оболочки желудка и кишечника). В результате исследований был получен гидролизат из слизистой кишечника и желудков, разработан режим гидролиза сырья, изучены физико-химические свойства гидролизата и доказано, что он отвечает требованиям, предъявляемым к сухому ферментативному пептону.

А.П. Простяков, С.И. Цыганкова, Л.И. Трусова (1985) получали гидролизаты из отходов производства изготовления препаратов иммуноглобулинов, т.е. из альбумина и серопротеина. Полученные гидролизаты соответствовали требованиям, которые предъявляют к белковым гидролизатам, предназначенным для изготовления питательных сред. Использование серопротеина и альбумина в качестве непищевого сырья для получения питательных сред позволяет их утилизировать, что выгодно с экологической и экономической точек зрения.

Гидролизаты из непищевого сырья, как основу питательной среды для культивирования *Bacteroides nodosus* (возбудитель копытной гнили овец), с успехом использовали И.А. Артюшина, Ю.Д. Караева, С.П. Рогожин (1987). Ими была подобрана рецептура полной питательной среды, в состав которой вошли:

- ферментативный казеиново-дрожжевой гидролизат;
- ферментативный гидролизат мышц сухой;
- фермолизат биомассы микроорганизмов;
- аминокептид (сухой), пептон и дрожжевой экстракт.

Накопление *B. nodosus* на полной питательной среде для всех штаммов, взятых в опыт, в 3-5 раз превышало накопление бактерий в питательной среде, приготовленной на основе мясного перевара Хоттингера.

Особенно интенсивно велись работы по поиску и применению различного непищевого сырья для получения из него гидролизатов и приготовления на их основе питательных сред для микроорганизмов в конце 80-х годов 20-го столетия. Об этом свидетельствуют многочисленные публикации многих авторов: Л.Я. Телишевская, О.А. Тугаринов, С.И. Цыганкова, Т.А. Великанова, У.Э. Неязов, Ф.С. Шуляк и др. (1987); Л.С.

Колабская, Л.И. Трусова, А.П. Простяков, Г.А. Сафонов и др. (1987); А.П. Простяков, С.П. Сергеева, Л.А. Булашова (1987); А.С. Фоменко, Н.И. Емельянов, Н.М. Белова, М.А. Кортеева (1987); П.В. Рыбалкин, Н.М. Потапов (1987); С.И. Цыганкова, В.И. Космына, Г.Г. Горбенко (1987); И.В. Мотыжова (1988); Л.Я. Телишевская, С.И. Цыганкова, Е.Г. Титова и др.(1988); А.Н Шуплинко, Л.В. Кириллов, Л.М. Первова, Е.Г. Лавченко (1989); Е.Г. Лавченко, А.Д. Чудинова, Л.Я. Телишевская и др. (1989).

Не только упомянутые, но и многие другие авторы использовали широкий ассортимент биологической промышленности – фибрин, форменные элементы крови, альбумины и другие белки сыворотки крови, мясные отходы при изготовлении вакцин, перепелиные яйца, сыворотку крови птиц, а также отходы молочной и мясной промышленности и т.д. в качестве непищевого сырья с целью приготовления питательных сред и культивирования бактерий. Исследования в этом направлении велись в 90-е годы прошедшего века и продолжают проводиться и в настоящее время. Ведущая роль в получении гидролизатов из непищевого сырья, приготовлении питательных сред, определении их качества и применении для культивирования бактерий принадлежит ученым ВГНКИ и специалистам биологической промышленности.

Значительные исследования по расширению сырьевой базы гидролизатов были связаны с использованием отходов производства эндокринных препаратов. Этими отходами являлись внутренние органы: легкие, поджелудочная железа, железистые ткани желудка и двенадцатиперстной кишки.

Сотрудники ВНИИ мясной промышленности и ВГНКИ провели совместные исследования и разработали технологию изготовления пептона из отходов эндокринного производства – жмыхов легких и жмыхов поджелудочной железы после извлечения инсулина (Л.Я. Телишевская, С.П. Сергеева, 2001).

Н.Д. Скичко и специалисты Щелковского биокомбината разработали способы приготовления гидролизатов из отхода вакцинного производства – баранины, после извлечения из нее антигенного материала для изготовления вакцины против бешенства.

С.И. Цыганкова, Л.И. Трусова (ВГНКИ) и специалисты Винницкого мясокомбината предложили технологию изготовления гидролизатов из ветконфискатов: автоклавированной массы костей, мышечной ткани и внутренних органов.

На Армавирской биофабрике Н.Г. Шептун под руководством А.П. Простякова (ВГНКИ) предложил использовать в качестве сырья фибрин для получения гидролизата и питательных сред.

На Херсонской биофабрике в качестве сырья для гидролиза использовали серопротейн и альбумин – белки сыворотки крови после фракционирования иммуноглобулинов полиэтиленгликолем.

А.П. Простяков, Л.И. Трусова, С.И. Цыганкова и другие для получения гидролизных питательных сред использовали белки молочной сы-

воротки. Они получили лактопептон, который можно использовать как основу питательной среды при замене мясной воды. Лактопептон можно использовать для производства вакцинных и диагностических препаратов.

Сотрудники ГНУ ВНИИ маслоделия и сыроделия Россельхозакадемии Д.В. Абрамов, Ю.Я. Свириденко, Д.С. Мягконосов и другие утверждают, что в этом учреждении разработаны гидролизаты, термокоагулированные из сывороточных белков молока технического и пищевого назначения. Гидролизаты технического назначения используются в качестве белковой основы – источника азота питательных сред для диагностики и культивирования бактерий и культур клеток. Гидролизаты пищевого назначения – источники белкового питания человека в тех случаях, когда нативный белок из-за физиологических нарушений организма не усваивается или вызывает патологические реакции.

Специалистами упомянутого учреждения предложен лактопептон бактериологический сухой, который применяется в качестве белковой основы широкого спектра микробиологических питательных сред. Исходным сырьем является подпрессованная альбуминовая масса с м.д. сухих веществ не менее 20%. Технология получения альбуминной массы предусматривает подкисление подсырной сыворотки кислой сывороткой, термическую коагуляцию и выделение сывороточных белков. Для получения качественного продукта отбирают альбуминную массу, полученную из сладкой сыворотки с кислотностью не выше 21°Т. При высоком содержании молочной кислоты (рН ниже 5,0) альбуминную массу промывают водой для удаления молочной кислоты, а к суспензии промытых белков добавляют богатую ростовыми факторами сухую сыворотку. Гидролиз проводят комплексом протеаз поджелудочной железы животных. Оптимальная глубина гидролиза белкового субстрата, обеспечивающая получение профиля наиболее ценных для метаболизма бактерий продуктов (полипептидов, пептидов и аминокислот), составляет 25-30%. По окончании процесса гидролизат нагревают для лучшей коагуляции нерасщепленного белка и инактивации ферментов, фильтруют до прозрачности, фильтрат концентрируют и высушивают распылением. Лактопептон представляет собой порошок, цвет - от светло-желтого до светло-коричневого, с характерным запахом, содержит влаги – 7%, азотистых веществ – 68,3%, в том числе пептидов – 38,6%, свободных аминокислот – 29,7%, лактозы – 7,5%.

В.И. Заерко (1996) предложил среду из гидролизатов куриных эмбрионов и кровяных сгустков, оценил пригодность ее для культивирования вакцинных штаммов сальмонелл, а затем использовал эту среду для производства живых вакцин против сальмонеллеза.

На Витебской биофабрике проведена экспериментальная работа по получению белковых гидролизатов из мяса волов-продуцентов гипериммунных сывороток, выбракованных в связи с истечением срока их эксплуатации, а также вынужденно убитых животных по различным причи-

нам (анафилактический шок, перелом конечностей, острая тимпания и т.д.). Опытная работа проведена А.П. Медведевым, Т.С. Вороновой, Т.В. Фроленко, И.П. Кулешовой (2002).

Для получения гидролизата мясо убитых животных измельчали на мясорубке, помещали в реактор с механической мешалкой, добавляли 1,5 л водопроводной воды на 1 кг фарша, подщелачивали химически чистой двууглекислой содой или 10%-ным раствором едкого натра до рН 7,8-8,0. На 1 л смеси добавляли 150-200 г очищенной от оболочек и измельченной на мясорубке поджелудочной железы крупного рогатого скота или 20-30 г панкреатина.

Гидролиз проводили в течение 5-6 суток при температуре 42-43°C. Первые 6 часов смесь перемешивали через каждый час, а затем 3-4 раза в сутки. Ежедневно определяли рН и в случае снижения показателя смесь подщелачивали до 7,8-8,0 10%-ным раствором едкого натра. О готовности переваара судили по падению процентного содержания триптофана.

Авторами, из опытных гидролизатов были приготовлены питательные среды для культивирования сальмонелл и эшерихий. Накопление бакмассы в этих средах было вполне приемлемым для производства вакцин против сальмонеллеза и эшерихиоза.

2.3.5. Фильтрация сред, их расфасовка

В условиях лаборатории питательные среды и различные жидкие компоненты, входящие в их состав, фильтруют через фильтровальную бумагу, вату, марлю, стеклянную вату, которые вкладывают в воронку. Кроме этого, для фильтрации сред применяют фильтровальное полотно, в некоторых случаях тонкий слой талька, каолина, инфузорной земли, животного угля, мела.

Наиболее распространенным бактериологическим фильтром являются свечи системы Пастера-Шамберлана из пресованного и обожженного при 1200°C каолина. Они имеют обозначения 1₁, 1₂, 1₃ и т.д. до 1₁₈. Цифры указывают величину пор, которая уменьшается в соответствии с порядковой нумерацией. А.Н. Бах и А.В. Виленский предложили ультрафильтрационные свечи, которые гораздо лучше, чем свечи иностранных марок (М.А. Бабич, 1963).

В лабораториях используют мембранные фильтры, которые представляют собой тонкие пластинки (0,1-0,2 мм толщиной), напоминающие пергамент из коллодия или нитроцеллюлозы. Они имеют мельчайшие поры и применяются для ультрафильтрации.

Жидкие питательные среды можно фильтровать через двойной складчатый фильтр из фильтровальной бумаги. Этот фильтр предварительно смачивают водой. Полотняные фильтры практичнее бумажных, так как их можно использовать многократно в отличие от однократного применения бумажных фильтров. Каждый вид среды фильтруют через отдельный полотняный фильтр. Новое фильтровальное полотно предварительно обрабатывают, т.е. кипятят 30 минут в воде с добавлением не-

большого количества едкого натра. После кипячения полотно тщательно промывают теплой водой и снова кипятят 15 минут в дистиллированной воде. Такая обработка необходима для смягчения полотна. После каждого очередного употребления полотно промывают водой и кипятят (М.О. Биргер, 1982).

В лабораторных и производственных условиях очень часто фильтрацию производят через ватно-марлевый фильтр. Для этого воронку (стеклянную, металлическую) покрывают марлевой салфеткой таким образом, чтобы края салфетки были перекинuty через край воронки наружу, а середина ее прилегала к внутренним стенкам воронки. Затем на марлю кладут слой гигроскопичной ваты и постепенно в воронку на вату наливают питательную среду. Через ватно-марлевый фильтр фильтруют полужидкие и плотные питательные среды, но для этого их предварительно прогревают текучим паром при температуре не ниже 70°C с целью расплавления находящегося в средах агара.

Для фильтрации больших объемов питательных сред на биофабриках используют многорамные фильтры, выпускаемые отечественной промышленностью и фильтрпластины марки «Ф», а при необходимости и марки «СФ».

Например, в лептоспирозном цехе УП «Витебская биофабрика» сывороточную питательную среду для выращивания лептоспир подвергают стерилизующей фильтрации, пропуская ее через пластины марки «СФ».

Расфасовку сред производят в пробирки по 5-10 см³, во флаконы по 50-100-200-400 см³. На биофабриках, где микроорганизмы культивируют в реакторах, среды расфасовывают в зависимости от их емкости и технических характеристик в объеме от 150 до 500 литров.

Расфасовку сред производят в предварительно тщательно вымытую и высушенную посуду. В случае стерилизации сред текучим паром или при давлении не более 0,5 атм., посуда должна быть простерилизована. Когда стерилизацию сред проводят путем автоклавирования под давлением не менее одной атмосферы, предварительную стерилизацию посуды не осуществляют.

Для расфасовки питательных сред в пробирки и флаконы пользуются воронкой или бюреткой, на нижний конец которой надета короткая резиновая трубка с небольшим стеклянным наконечником. Резиновая трубка снабжена зажимом Мора. При расфасовке во флаконы по 200 и 400 см³ пользуются мерными стаканами. Расфасовывать питательную среду необходимо так, чтобы не смачивать края пробирок или горлышки флаконов, иначе ватно-марлевая пробка, смоченная средой, присыхает к стеклу и может прорасти микробами.

Плотные среды используют в микробиологии со времен Роберта Коха, который предложил применять в качестве уплотнителя агар. Агар получают путем экстракции красных морских водорослей. Это самый широко употребляемый уплотнитель бактериологических сред. Он состоит из двух полисахаридов – агарозы и агаропектина. В составе агара

преобладает агароза. На ее долю приходится около 70% всей смеси.

Для проведения бактериологической работы агар удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют его в качестве питательного субстрата. Агар не разрушается ферментами большинства видов микробов, в воде образует гели, плавящиеся при 100°C и затвердевающие при температуре около 40°C. Поэтому на плотных средах можно культивировать микроорганизмы при подходящей для их роста температуре. Большинство патогенных микроорганизмов культивируют в диапазоне температуры от 37 до 38°C. Агаровые гели имеют высокую степень прозрачности, что является не маловажным их качеством при изучении культуральных свойств микробов. При остывании агар выделяет конденсационную воду: чем меньше концентрация агара, тем больше выделяется воды.

Обычно агар добавляют к средам в количестве 2%. В случае, если необходимо получить более влажную среду, вносят 1,5%, а более плотную и сухую – 3% агара. Для приготовления плотной питательной среды вначале доводят рН основной жидкой среды до необходимой величины, а затем добавляют агар, который выпускают в виде пластинок, «стебельков» или порошка. Бактериологический агар незначительно изменяет рН среды.

После добавления агара к основной жидкой среде смесь нагревают до кипения, чтобы полностью растворить агар. В процессе нагревания среду необходимо постоянно перемешивать, чтобы не допускать осаждения агара на дно, где он может карамелизоваться и обуглиться. Дают среде покипеть около 1 минуты, следя при этом, чтобы агар не вспенивался. Расплавленную среду расфасовывают в пробирки, наполняя до одной трети их высоты, закрывают ватно-марлевыми пробками, стерилизуют, а перед посевом расплавляют в водяной бане и «скашивают». Для получения скошенного агара пробирки с расплавленной средой кладут на стеклянные палочки и дают среде остыть и затвердеть. Среда не должна доходить до пробки на 5-6 см. Среда, предназначенную для культивирования в чашках Петри, расфасовывают в пробирки большего объема по 20-30 см³, чтобы можно было при необходимости расплавить среду и внести ее в чашки в указанном объеме. Следует знать, что в слабокислых, нейтральных и слабощелочных средах агар сохраняет способность образовывать гель после нескольких циклов плавления и затвердевания. Однако в кислой среде с рН 6,0 и ниже агар при стерилизации частично гидролизуются и поэтому после охлаждения не образует геля. Учитывая это, агар следует стерилизовать отдельно от среды и добавлять его в среду после стерилизации.

Агар с высоким уровнем примесей необходимо очищать. С этой целью применяют следующую лабораторную процедуру. Агар, подлежащий очистке, замачивают в 10 объемах дистиллированной воды, оставляя его в воде на 2-3 часа, а затем фильтруют. Эту операцию повторяют до 10 раз в течение 2 суток. Полученный агар погружают в равный объем 95%-ного этанола и оставляют на 12 часов при комнатной температуре, а за-

тем фильтруют. Затем вновь погружают агар на 4 часа в свежий раствор этанола и фильтруют еще раз. После этого вносят агар в кипящий 95%-ный этанол, доводят до кипения и фильтруют. Очищенный агар сушат при комнатной температуре.

Агар всегда содержит примеси органических и минеральных веществ, поэтому его предварительно очищают или как говорят, «выщелачивают». Агар, подлежащий очистке, вносят в стеклянную или эмалированную посуду, заливают водопроводной водой и ставят в термостат при 30-37°C.

Примеси диффундируют в воду и разлагаются под влиянием развивающихся в ней микроорганизмов. Спустя сутки-двое жидкость сливают, агар промывают водой несколько раз, снова заливают водой и ставят в термостат. Когда вода помутнеет, ее заменяют свежей водой, повторяя это до тех пор, пока не исчезнет запах и вода перестанет мутнеть. Опыт показывает, что через 2-3 недели агар лишается растворимых органических веществ, т.е. становится очищенным. Затем агар помещают в двойной марлевый мешок и 2-3 суток промывают проточной водопроводной водой. После этого агар просушивают на воздухе или в сушильном шкафу при 35-38°C.

При необходимости культивирования бактерий в чашках Петри, вначале среду расплавляют в водяной бане, затем охлаждают до 45-50°C с соблюдением правил асептики разливают в стерильные чашки. После внесения среды в чашки их накрывают бумагой или другим изолирующим материалом, так как на стеклянных крышках конденсируется влага. При затвердевании агара на его поверхности образуются капли влаги, поэтому перед засевом бактерий этой влаге дают возможность испариться. Хранение чашек в перевернутом положении при комнатной температуре обычно обеспечивает достаточное высыхание агара. Можно ускорить подсыхание плотной среды. Для этого чашки помещают в термостат, расположив их в наклонном положении и оставив их там до полного исчезновения мельчайших капель влаги.

При хранении чашек с плотной средой необходимо предохранить среду от чрезмерного высыхания, поместив чашки в полиэтиленовые пакеты. В них можно хранить чашки со средой при комнатной температуре в течение 4-5 недель. Плотные и жидкие питательные среды хранят в темном месте. Хранение сред на свету может привести к фотохимическому образованию перекиси водорода или других токсических форм соединений кислорода, присутствие которых в средах может ингибировать рост бактерий.

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 ($C_6H_{10}O_4$)п, составляющий 20-25%, пептозаны ($C_6H_8O_4$)п – около 3%.

Основное вещество 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 арабинозы, глюкозы, галактозы и др.

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

Прежде, чем использовать 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 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% студень не должен иметь запаха.

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

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

$$X = \frac{(a - б) \times 100}{a - в}, \quad (1)$$

где а – вес стакана с крышкой и агаром до сушки в г;

б – 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 (х) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a - б) \times 100}{a - в}, \quad (2)$$

где а – 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 см³ 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 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 рожки свиней или двумя видами микроорганизмов кокковой группы (*S. aureus*, *S. albus* или другими кокками).

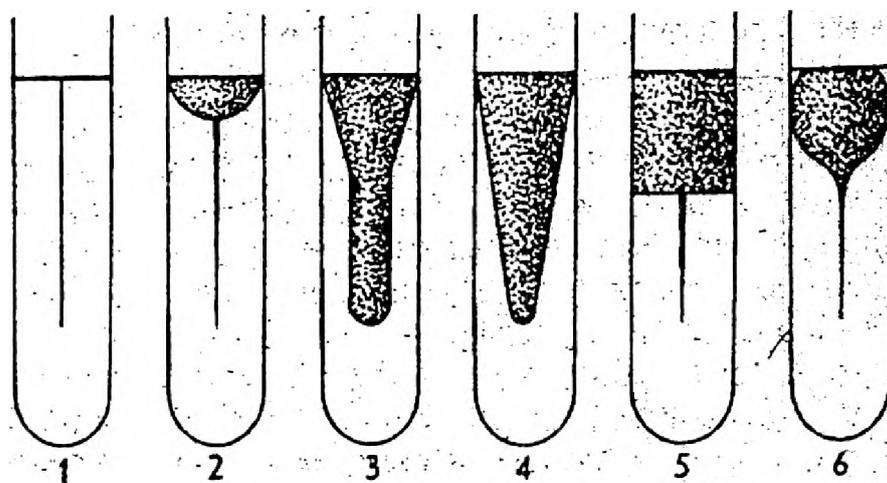
Агар считают качественным, если засеянные микробы дают обильный и типичный рост при сохранности их биологических свойств.

Кроме агара, для уплотнения некоторых сред используют желатину, кремнекислый гель (силикагель), каррагенан.

Желатина представляет собой белок, который получают путем вываривания костей и хрящей животных. Желатиновый гель плавится при температуре 23-28°C, поэтому культивировать большинство патогенных микроорганизмов на средах, уплотненных с помощью желатины, не представляется возможным ввиду того, что их рост осуществляют при температуре 37-38°C. Кроме этого, желатина разжижается протеолитическими ферментами многих микроорганизмов. Эти свойства препятствуют широкому применению желатины в качестве уплотняющего средства. Ее используют в основном для выявления протеолитической активности микробов, а также получения «гигантских» и глубинных колоний дрожжей с целью их идентификации.

Желатину добавляют к жидким средам в количестве 10-15% и оставляют ее набухать 10-15 минут, затем нагревают на водяной бане до полного растворения, после чего устанавливают рН среды 6,8-7,0 и стерилизуют при 0,5 атм. в течение 15 минут. Повторную стерилизацию желатиновых сред проводить не рекомендуют потому, что желатина при этом теряет способность образовывать гель. Особенно гелеобразующая способность ее утрачивается при рН сред ниже 6,0 и выше 7,3.

Многие патогенные микробы разжижают желатину, что свидетельствует об их протеолитической активности. Например, стафилококки, протеи, псевдомонады, сибиреязвенные бациллы, возбудители злокачественного отека и другие (рисунок 4).



- 1 - линия укола (разжижение отсутствует); 2 - разжижение в форме гвоздя;
 3 - разжижение в форме чулка; 4 - разжижение воронкой;
 5 - разжижение послойное; 6 - разжижение реповидное.

Рисунок 4 - Разжижение МПЖ при посеве микроорганизмов, продуцирующих протеолитический фермент желатиназу

Кремнекислый гель (силикагель) – вещество неорганической природы, которое используют как плотную основу для синтетических сред определенного состава. В лаборатории силикагель готовят следующим образом. К соляной кислоте с удельным весом 1,1 добавляют при постоянном помешивании равный объем жидкого стекла того же удельного веса. Затем смесь разливают в чашки Петри по 25-30 см³. Для образования геля чашки расставляют на горизонтальной поверхности и оставляют в покое на несколько часов. После уплотнения содержимого чашек их открывают, помещают в эмалированную емкость и промывают водопроводной водой для удаления хлоридов. Наличие хлоридов проверяют качественной реакцией с 1-5%-ным раствором AgNO₃. Поскольку водопроводная вода содержит значительное количество ионов хлора, гель перед постановкой реакции промывают горячей дистиллированной водой. Затем смыв наливают в чистую пробирку и добавляют 2-3 капли раствора AgNO₃. В присутствии хлоридов смыв мутнеет или же образуется белый осадок. Если смыв остается прозрачным – гель готов к употреблению. Отмытый от хлоридов гель пропитывают 2-3 см³ соответствующей синтетической среды и подсушивают в сушильном шкафу при 50-60°C, следя за тем, чтобы он не пересох, что нарушает структуру геля и делает непригодным для работы. Чашки с гелем при необходимости можно стерилизовать. Для этого их завертывают в пергаментную бумагу и, не переворачивая, стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. 15 минут. До употребления чашки с кремнекислым гелем хранят в сосудах под водопроводной водой (Е.И. Козлова, Н.Н. Гречушкина, 1976).

Уплотнение сред с помощью силикагеля применяют для получения культур автотрофных бактерий, так как при этом в среде отсутствуют органические вещества. Кроме этого, при добавлении в такие минеральные среды различных органических веществ можно определить способность гетеротрофных бактерий, использовать их в качестве единственных источников углерода. Благодаря наличию силикогелевых сред можно также определить потребность бактерий в витаминах.

Каррагенан («ирландский мох», «растительная желатина») является экстрактом определенных видов красных морских водорослей. Известно несколько типов каррагенана: каппа, лямбда, мю, йота. Калиевые соли каррагенана типа каппа могут образовывать плотные прозрачные гели, которые являются заменителями агара во многих средах для культивирования определенных видов микроорганизмов.

Каррагенан значительно дешевле агара. Аналогично агаровым гелям, гели из каррагенана не разрушаются ферментами большинства видов микроорганизмов. Гели из каррагенана устойчивы к высоким температурам. Они плавятся при температуре 55-60°C, поэтому их разливают по чашкам Петри после разогревания до указанной температуры. Каррагенан не пригоден для приготовления полужидких сред. Он способен менять рН среды, поэтому для предупреждения изменения концентрации водородных ионов следует готовить среды с различными исходными значениями рН или увеличивать их буферную емкость. Каррагенан типа каппа и лямбда пригоден для приготовления плотных сред, предназначенных для разных целей. Плотные среды с применением каррагенана готовят так же, как и среды с использованием агара. Чтобы получить плотную среду, устойчивую к температуре 45°C, добавляют в жидкую среду 2% каррагенана, а устойчивую к температуре 60°C – 2,4% вещества. Добавив каррагенан к основной жидкой среде, ее кипятят, чтобы полностью растворить его, а затем стерилизуют автоклавированием. После стерилизации среду охлаждают до 55-60°C, разливают по чашкам Петри и дают застыть. Конденсирующуюся на геле влагу удаляют таким же способом, что и с плотных сред, приготовленных с применением агара.

Для получения хорошо видимых изолированных колоний микроорганизмов необходимо иметь прозрачные плотные среды. Одним из компонентов плотных сред является жидкая ее часть, которая осветляется путем фильтрации. Агар, применяемый в качестве уплотнителя, также осветляют путем фильтрации его в расплавленном виде. Кроме этого, агар можно осветлять другим простым способом. Вместо фильтрации расплавленный агар наливают в высокие цилиндры и помещают на ночь в термостат при температуре 37-38°C, т.е. дают агару медленно остыть. При этом, частицы, обуславливающие помутнение агара, оседают на дно, образуя визуально различимый мутный осадок. Затем цилиндры с агаром нагревают в горячей воде, агар вытряхивают из них, нижнюю часть (осадок) удаляют, а оставшуюся часть измельчают, расплавляют и используют по назначению. Когда этого бывает недостаточно, среду осветляют с

помощью белков куриных яиц, используя свежие куриные яйца. Для осветления 500 см³ среды достаточно белка одного яйца. Белок аккуратно отделяют от желтка и тщательно смешивают с равным объемом воды до образования густой пены. Смесь белка с водой вносят в предварительно расплавленную и охлажденную до 45-50°С среду. Перед внесением белка проверяют значение рН среды и при необходимости подщелачивают среду до рН 7,0-7,3. Затем среду с белком перемешивают и прогревают в кипящей водяной бане в течение часа. Добавленный белок свертывается и адсорбирует все взвешенные в среде частицы. Крупнохлопчатый осадок легко отделяется фильтрованием. Фильтрованную среду в горячем состоянии расфасовывают и стерилизуют при 1 атм. 30 минут. Для осветления, вместо яичного белка, можно применять кровяную сыворотку лошади или другого вида животных. Сыворотку добавляют в количестве 20-30 см³ на 1 литр среды. Однако, необходимо помнить, что от прибавления белка или сыворотки, среда иногда делается еще более мутной. Поэтому делают предварительную пробу просветления среды в пробирке, прибавив к 10 см³ питательной среды 0,3 мл растворенного в воде белка или кровяной сыворотки.

Синтетические плотные среды осветляют следующим образом. Среду, налитую в химический стакан, автоклавируют и оставляют в закрытом автоклаве на 10-12 часов. За это время среда медленно остывает и все взвешенные частицы оседают на дно. Затем среду извлекают из стакана, нижнюю мутную часть среды удаляют, а верхнюю помещают в колбу и вновь стерилизуют.

2.3.6. Стерилизация питательных сред

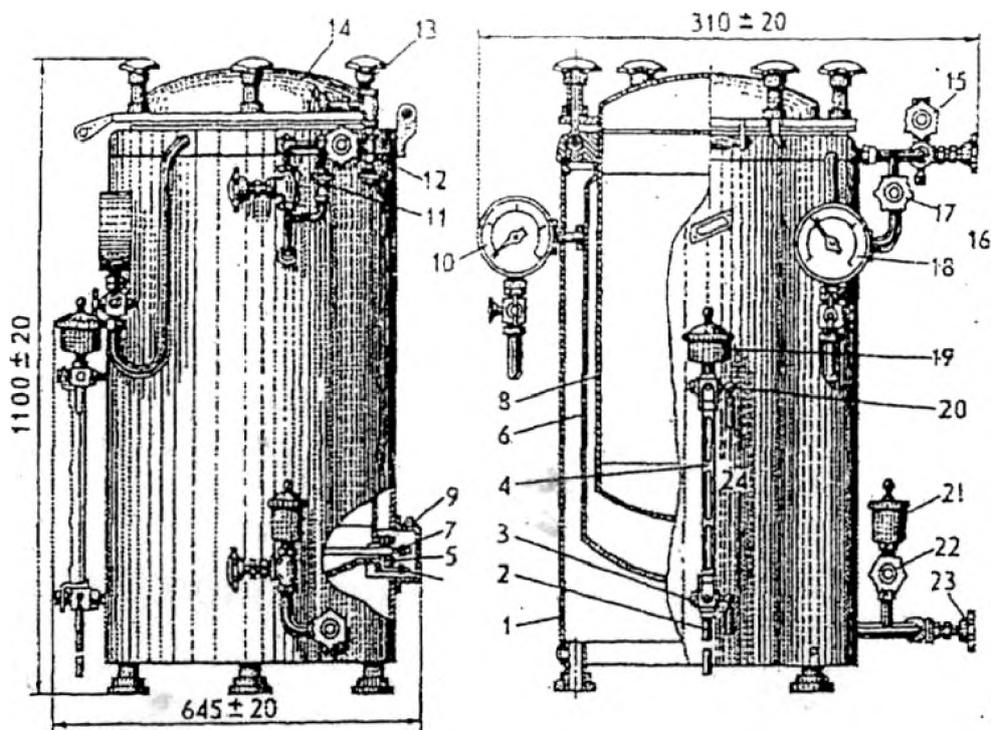
Стерилизация – один из важнейших и необходимых приемов в микробиологической практике. Слово «стерилизация» в переводе с латинского означает обеспложивание. В микробиологии под стерилизацией понимают инактивацию как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов. Стерилизация питательных сред, посуды, инструментов – необходимое условие успешной работы сотрудников любой микробиологической лаборатории. Существуют многочисленные способы стерилизации, однако, питательные среды, в основном, стерилизуют автоклавированием. Сущность этого способа стерилизации сводится к воздействию насыщенного пара на стерилизуемый субстрат при высоком давлении. Высокое давление обеспечивает повышение температуры пара, что гарантирует надежность стерилизации. Автоклавирование проводят в специальных аппаратах – автоклавах.

В настоящее время промышленность выпускает автоклавы электрические горизонтальные и вертикальные. Автоклавы могут быть различной конструкции, но их устройство принципиально одно и то же. Автоклав представляет собой двустенный металлический котел цилиндрической формы, снабженный герметически закрывающейся крышкой. Он способен выдерживать высокое давление. Современные автоклавы обо-

рудованы электронагревательными приборами, манометрами, моновакуумметрами.

Внутренняя часть автоклава является стерилизационной камерой, в которую помещают стерилизуемый материал. Пространство между стенками автоклава называют водопаровой камерой. В ее до определенного уровня наливают воду, которая при электроподогреве закипает, и пар проникает через специальное отверстие в стерилизационную камеру. Эта камера снабжена краном для выхода воздуха, манометром для определения давления и предохранительным клапаном для выхода пара в случае повышения давления сверх необходимого.

Автоклав представляет собой прибор повышенной опасности. Поэтому для проведения автоклавирования допускаются лишь специально обученные лица, имеющие соответствующее удостоверение и допуск к работе с автоклавом.



- 1 - кожух; 2 - шланг; 3 - кран нижний; 4 - колонка водоуказательная; 5 - гайка крепления электроэлементов; 6 - камера водопаровая; 7- электроэлемент; 8 – стерилизационная камера; 9 - коробка; 10 - манометр электроконтактный; 11- предохранительный клапан; 12 - эжектор; 13 - прижим; 14 - крышка; 15 - вентиль воды; 16 - вентиль эжекционный; 17 - вентиль пара; 18 – мановакуумметр; 19 - воронка; 20 - кран верхний; 21 - фильтр; 22 - вентиль фильтра; 23 – вентиль конденсата; 24 – водоуказательная колонка.

Рисунок 5 - Схема вертикального автоклава АВ

Схема устройства вертикального автоклава приведена на рисунке 4.

Жидкие питательные среды, предназначенные для автоклавирования, наливают наполовину объема сосудов, в которые они расфасованы (колбы, пробирки). Сосуды со средами закрывают ватно-марлевыми

пробками, которые должны быть достаточно плотными и предохранять среду после стерилизации от попадания в нее микроорганизмов из воздуха. Не рекомендуется обертывать пробки колб, пробирок целлофаном или другим материалом, не пропускающим пар, т.к. среды могут не нагреться до нужной температуры и не простерилизуются.

Для проведения автоклавирования сосуда с расфасованными средами помещают в стерилизационную камеру на специальную решетку. В водопаровую камеру наливают дистиллированную воду, закрывают автоклав крышкой, плотно завинтив фиксирующие ее винты. Затем открывают кран, соединяющий стерилизационную камеру с наружным воздухом, и включают электрообогревательное устройство в электросеть. В водопаровой камере вода закипает, и пар начинает выходить наружу. Пар выпускают в течение 10-15 минут. Это необходимо для того, чтобы весь воздух из автоклава был вытеснен паром, иначе смесь пара и воздуха при одном и том же давлении будет иметь температуру более низкую, чем температура насыщенного пара. После вытеснения воздуха, паровыводящий кран перекрывают и следят за показаниями манометра. По достижении необходимого давления отмечают время, означающее начало стерилизации. По истечении заданного времени электронагревательное устройство отключают от электросети и выдерживают автоклав отключенным до того времени, пока стрелка манометра не упадет до нулевой отметки. После этого открывают паровыводящий кран. Открывание этого крана даже при незначительном давлении не допустимо, т.к. нагретые среды при резком снижении давления закипают, что приводит к выталкиванию пробок из сосудов или же их смачиванию и нарушению стерильности сред. Крышку автоклава желательно открывать после его полного охлаждения. Простерилизованные среды помещают в термостат на 2-3 суток с целью контроля их на стерильность. Отсутствие визуально определяемого пророста сред – свидетельство их стерильности.

Каждому определенному давлению насыщенного пара в стерилизационной камере соответствует определенная температура. При давлении 0,5 атм. температура достигает 110-112°C, при 1 атм. – 120-121°C, при 1,5 атм. – 124-126°C, а при давлении в 2 атм. температура повышается до 132-133°C.

Длительность стерилизации сред и температура, при которой проводится автоклавирование, зависят от состава питательных сред. МПБ, МПА стерилизуют при 1 атм. 20-30 минут. Такие среды, как молоко, дрожжевой автолизат, дрожжевую воду, автоклавируют при 0,5 атм. 15 минут. При таком же режиме автоклавирования стерилизуют среды с желатиной. Среды, содержащие сахара и витамины (среды Гисса, пивное сусло, соки) автоклавируют при 0,5 атм. 20-30 минут.

При выборе режима стерилизации учитывают значение рН среды. При автоклавировании сред с кислой реакцией могут гидролизовать входящие в их состав полимеры. В случае стерилизации сред с рН ниже 6,5-6,0 происходит пептонизация желатины. При рН среды ниже 5,0 подвер-

гается гидролизу агар, и он теряет способность образовывать гель. При щелочном значении рН среды в процессе стерилизации выпадают в осадок соли железа, а сахара карамелизуются и становятся недоступными для микробов. Поэтому среды, предназначенные для выращивания кислото- и щелочелюбивых бактерий, стерилизуют при нейтральном значении рН, а затем, после автоклавирования, устанавливают необходимое для культивирования конкретного вида микробов рН. Ряд компонентов питательных сред стерилизуют отдельно при таком рН и режиме, которые не изменяют их свойства, а затем добавляют в среды в необходимом количестве.

Для стерилизации питательных сред кроме автоклавирования используют другие методы: тиндализацию и стерилизацию фильтрованием (механическая стерилизация). Эти способы используют в том случае, когда в состав питательных сред входят компоненты, разрушающиеся при автоклавировании или применении других методов стерилизации.

Тиндализация – это способ стерилизации, заключающийся в воздействии на питательную среду температуры в 56-58°C в течение 5-6 дней подряд по 40 минут. В перерывах между прогреваниями обрабатываемую среду выдерживают при комнатной температуре с целью прорастания спор в вегетативные формы бактерий, которые при последующих прогреваниях полностью инактивируются. Можно применять и другой режим инактивации: прогревать питательную среду по 2 часа в первый день и по 1 часу в последующие 4-5 дней при указанной выше температуре (Т.С. Костенко, Е.И. Скаршевская, С.С. Гительсон, 1989).

Механическая стерилизация – это стерилизация, заключающаяся в пропускании питательной среды через бактериальные ультрафильтры, задерживающие клетки микроорганизмов.

Медицинская промышленность изготавливает фильтры из каолина, асбеста, керамики, кварцевого песка, нитроцеллюлозы. Наибольшее применение находят фильтры асбестовые и мембранные из нитроцеллюлозы.

В лабораториях применяют асбестовые фильтры Зейтца (рисунок 6).

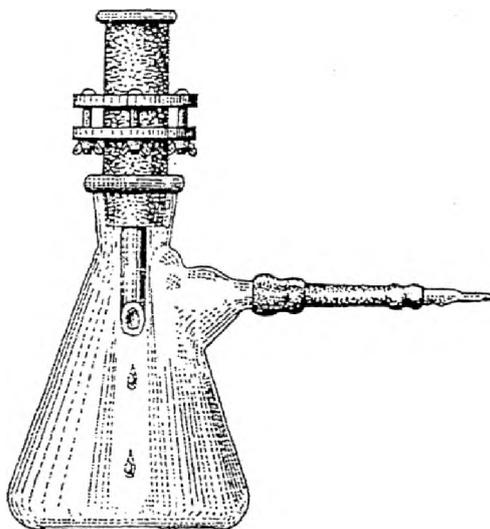


Рисунок 6 - Фильтр Зейтца

Асбестовые пластинки помещаются на сеточку, которая находится между полым металлическим цилиндром и нижней частью приспособления, имеющего форму воронки с сетчатым дном. Цилиндр прочно крепят с воронкой с помощью специальных винтов. Затем воронку вставляют в отверстие резиновой пробки, а пробкой закрывают плоскодонную колбу с отводной трубкой и стерилизуют в автоклаве. Для проведения фильтрации отводную трубку колбы присоединяют к вакуум-насосу, в цилиндр наливают фильтруемую жид-

кость и включают в сеть электронасос. Фильтруемая жидкость (питательная среда, раствор антибиотиков, сок, сыворотка крови и др.) проходит через фильтровальную пластинку, а микробы задерживаются пластинкой и остаются на ее поверхности (А.А. Солонко, А.А. Гласкович, В.Н. Алешкевич, Ф.Е. Тимофеев, Н.Х. Федосова, 2000).

В редких случаях для стерилизации белковых сред прибегают к применению бета-пропионалактона, окиси этилена.

В биологической промышленности для стерилизации питательных сред используют многорамные фильтры, которые монтируются фильтр-пластинками марки «Ф» для грубой фильтрации и марки «СФ» для стерилизующей фильтрации. Многорамные фильтры и указанные фильтровальные пластины широко применяют на биофабриках при производстве противолептоспирозных препаратов для стерилизации сывороточной среды, предназначенной для культивирования лептоспир (Ю.А. Малахов, А.Н. Панин, Г.Л. Соболева, 2001).

Практика фильтрации питательных сред показывает, что мембранная технология очистки их требует предварительного фильтрования, как и других биологических жидкостей через фильтровальный материал типа бумаги и картона.

Надо иметь в виду, что к фильтровальным материалам предъявляют ряд требований:

- эффективная очистка среды или же другого биологического продукта от механических примесей и микроорганизмов;
- высокая пропускная способность применяемых фильтров;
- биологическая инертность используемых фильтров и минимальные потери фильтруемого продукта и его биологически активных веществ;
- отсутствие миграции в фильтрат из фильтра веществ в растворенном и твердом состоянии, способных смещать величину рН среды, что может вызывать денатурацию биологически активных компонентов и вызывать загрязнение фильтруемой жидкости.

На предприятиях биологической промышленности для фильтрации питательных сред, альбумина, гипериммунных сывороток и т.д. используют отечественные и зарубежные асбестоцеллюлозные фильтровальные материалы. Процесс фильтрования питательных и других жидких биологических сред через отечественные фильтрпластины, как правило, является многоступенчатым, т.е. сначала проводится грубая фильтрация через пластины марки «Ф», затем тонкая – через пластины марки «СФ-1», а потом -стерилизующая фильтрация через пластины марок «СФ-2», «СФ-3», «СФ-4», «СФ-5».

Известны иностранные фильтровальные пластины фирмы «Зейтц» марок К-10, ЕКС – для грубой фильтрации и марок ЕКС-1 и ЕКС-2 - для стерилизующей фильтрации не только питательных сред, но и многих биологических жидкостей.

Указанные выше фильтровальные пластины имеют некоторые от-

рицательные свойства. В процессе фильтрования происходит защелачивание фильтруемой среды. Из фильтрпластин вымывается значительное количество кальция, магния и других веществ, ухудшающих качество фильтратов, кроме этого в фильтруемую среду мигрируют мельчайшие волокна, что крайне нежелательно. Все указанные недостатки фильтрпластин связывают с входящим в их состав асбестом хризотилowym (М.П. Залеская и др., 1978).

Поэтому А.В. Канарский, Н.В. Платицина, Д.М. Фляте, В.П. Гайденко, Т.К. Горшкова, В.А. Карпук (1981) предложили обрабатывать фильтрпластины в кислой среде, что позволяет улучшить их стерилизующие свойства и пропускную способность, а также исключать вымываемость веществ в фильтруемую жидкость.

В.П. Гайденко, В.А. Карпук (ВНИТИБП) существующее большое разнообразие фильтрующих материалов подразделяют на две группы – мембранные и глубинные фильтры. Глубинные фильтры состоят обычно из волокон, частиц или фрагментов, образующих единую массу, в которой имеются извилистые каналы или поры. Размеры каналов и пор варьируют и намного превышают размеры задерживаемых частиц, в частности, микроорганизмов. Однако фильтрующая способность этих фильтров обеспечивается суммарным действием различных факторов, таких как инерционное осаждение, седиментация, электростатические и вандерваальсовы силы и т.д. К глубинному типу фильтров относят асбестовые, асбесто-целлюлозные пластины, керамические свечи, мелкопористое стекло, металлокерамика и т.д.

Глубинные фильтры имеют высокую поглотительную способность, что позволяет успешно использовать их для очистки сильно загрязненных растворов. Однако эти фильтры имеют некоторые недостатки. При увеличении разности давления контаминирующие организмы могут пройти через фильтр и попасть в фильтрат. Поэтому глубинные фильтры характеризуются определенной номинальной, а не абсолютной производительностью. Отрицательной стороной глубинных фильтров, особенно при длительной фильтрации, является проникновение бактерий в фильтрат и прорастание их в нем. Зачастую, при фильтрации через асбестовые пластины, изменяется рН фильтруемой среды на 0,2-0,6, что свидетельствует о вымывании из фильтрматериала веществ, которые могут оказывать отрицательное воздействие на культивируемые микробы.

Зарубежные фирмы разрабатывают и выпускают мембранные фильтры. Их изготавливают из полимерных материалов, которые биологически инертны. Толщина мембранных фильтров составляет 150-200 мкм. Они обладают очень малой абсорбционной емкостью, и поэтому в их матриксе задерживается ничтожное количество жидкости, что весьма ценно при фильтрации дорогостоящих биологических растворов. Через эти фильтры можно пропустить без потерь от нескольких миллиметров до нескольких сотен литров жидкости.

Фирма «Миллипор» выпускает различные мембранные фильтры,

изготовленные из очищенных эфиров целлюлозы, нейлона, поливинилхлорида, тефлона. Все эти материалы биологически инертны, не оказывают токсического действия на микроорганизмы, устойчивы к воздействию высокой температуры (140-200°C), обладают высокой скоростью фильтрации, которая в 30-40 раз превышает скорость фильтрации через глубинные фильтры.

2.3.7. Краткие сведения о культивировании микроорганизмов

Культивировать микроорганизмы – это значит искусственно создавать условия для их роста и размножения. В микробиологических лабораториях микроорганизмы культивируют *in vitro*, т.е. в стеклянных пробирках, колбах, флаконах и других сосудах. В настоящее время промышленность выпускает для лабораторных нужд посуду не только из стекла, но и из других материалов. Для культивирования *in vitro* необходимы питательные субстраты, которые микроорганизмы используют в качестве питательных веществ. В процессе развития и становления микробиологии были предложены для культивирования микробов многочисленные питательные среды. В зависимости от целей выращивания микроорганизмов, их видовой принадлежности состав питательных сред варьирует в широких пределах.

Одна из особенностей микроорганизмов – их необычайная зависимость от условий окружающей среды. Малые размеры клеток определяют тесный контакт микробов со средой, поэтому они реагируют на изменение условий среды в большей степени, чем другие живые существа. Решающее значение для жизнедеятельности микроорганизмов имеет набор и соотношение компонентов питательной среды. Чрезвычайно важны также физико-химические факторы: кислотность среды (pH), окислительно-восстановительные условия (Eh), аэрация, температура, свет и другие.

Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах каждого фактора. Для представителей различных групп микроорганизмов эти пределы часто неодинаковы. Изменение того или иного фактора в границах, допускающих развитие микроорганизмов, существенно влияет на их рост и обмен веществ.

Для каждого конкретного вида микроорганизмов имеются пороговые уровни питательных веществ, необходимые для роста и размножения, ниже которых наступает голодание. При голодании происходит уменьшение и фрагментация клеток, появление ультрамикрочорм. Наблюдается увеличение отношения площади поверхности клетки к ее объему – явление, вполне известное для многих микробов. Некоторые виды бактерий вырабатывают специальные формы для переживания условий голодания – споры, цисты.

По нашему мнению, необходимо различать лабораторное культивирование микроорганизмов и промышленное. Такое различие обосновано

вываается целями, а также задачами, стоящими перед производственными, научно-исследовательскими лабораториями и биологической промышленностью. Непроходимой границы между лабораторным и промышленным культивированием микробов провести нельзя, так как во многих случаях их цели и задачи, принципы культивирования совпадают. Однако, когда дело касается масштабирования процесса культивирования определенного вида микроорганизмов, то почти всегда не удается получить воспроизводимые результаты. Масштабирование – это перенесение процедуры культивирования, разработанной в лаборатории, в производство. Известно, что процесс выращивания микроорганизмов может быть малоэффективным в условиях крупного производства. Народному хозяйству необходимы крупномасштабные биотехнологические производства. При переходе от лабораторных условий культивирования к промышленным масштабам главное – это максимальный выход продукта при минимальных энергетических, материальных и временных затратах. Одной из важных задач промышленного культивирования является увеличение выхода целевого продукта (клеточной массы, внутриклеточных или внеклеточных продуктов), точнее, увеличение выхода продукта по отношению к потребленному субстрату. Выход продукта по отношению к потребленному субстрату (питательной среде) называют экономическим коэффициентом (Y). Чем выше Y (от английского *yeald* – выход, урожай), тем выше продуктивность биотехнологического процесса. При низкой продуктивности производство оказывается нерентабельным и неконкурентоспособным. Промышленное культивирование может быть рентабельным при осуществлении оптимизации в таком направлении, которое должно привести к получению максимально высокой концентрации продукта, высокой полноте конверсии субстрата в целевой продукт, хорошей воспроизводимости процесса. Промышленное культивирование преследует получение продуктов трех типов: 1) клеточной массы; 2) первичных продуктов; 3) вторичных продуктов. Целевым продуктом могут быть клетки микроорганизмов или их метаболиты: внутриклеточные – сохраняющиеся в клетках и внеклеточные – выделяющиеся наружу. Поэтому в первую очередь необходимо изучать и знать динамику роста культуры каждого культивируемого вида бактерий, биосинтеза различных метаболитов и потребление веществ питательной среды. Такое знание позволяет установить параметры роста, определить связь синтеза метаболитов с ростом, дать количественную характеристику процессу культивирования.

Вторым этапом оптимизации является определение ростостимулирующего фактора, который оказывает решающее влияние на выход целевого продукта. Этим фактором может быть С, О, N, S, P и другие. Третий этап оптимизации культивирования сводится к подбору оптимальной среды, обеспечивающей хороший рост микробов и не содержащей компонентов, репрессирующих синтез целевого продукта. Следующий, четвертый этап оптимизации культивирования сводится к подбору способа культивирования, наиболее благоприятного для получения бактериаль-

ной массы, экзо- и эндотоксинов и других метаболитов.

Промышленное культивирование микроорганизмов – это сложный биотехнологический процесс, составляющими которого являются питательная среда, аппаратурно-техническое обеспечение и режим культивирования бактерий (А.Я. Самуйленко с соавт., 1999).

Процесс культивирования микроорганизмов имеет большое значение в производстве средств, специфической профилактики инфекционных болезней животных и птиц, так как на этом технологическом этапе происходит синтез антигенов, необходимых для изготовления иммунопрепаратов различного назначения.

Промышленное культивирование микроорганизмов имеет некоторые особенности, которые сводятся к следующему.

Выращивание микробов в условиях строгой чистоты культуры вызывает необходимость стерилизации как основной, так и вспомогательной аппаратуры, а также питательной среды и всех компонентов, вносимых в реактор. Процесс культивирования должен осуществляться в условиях, исключающих проникновение посторонней микрофлоры в ферментер, что требует специальной аппаратуры, приборов, арматуры и т.д. Это учитывают при конструировании ферментеров, предназначенных для выращивания бактерий, а также в случае приспособления для их культивирования аппаратов, используемых в химической и пищевой промышленности.

Культивирование микроорганизмов ведут в трехфазной системе газ – жидкость – плотное тело (клетки) с меняющимися в ходе процесса реологическими свойствами. Это вызывает значительные трудности при переходе от лабораторных моделей к промышленным установкам.

Особенностью промышленного культивирования является необходимость использования больших объемов воздуха как дешевого источника кислорода из-за низкой его растворимости в питательной среде и культуральной жидкости.

У микробов, по сравнению с химическими реакциями, скорость протекания биосинтеза низкая, но высокая чувствительность их к воздействию физико-химических и механических факторов.

Многокомпонентность питательных сред, способность их и растущей культуры образовывать пену, сложность механизмов регуляции роста бактерий, нестабильность в ряде случаев целевых продуктов – обуславливают определенные трудности при промышленном культивировании микроорганизмов (У.Э. Виестур, М.Ж. Кристапсонс, Е.С. Былинкина, 1980).

В связи с отмеченным, поиск оптимальных условий культивирования разнообразных видов микробов – весьма сложная задача.

По нашему мнению, решение этой задачи связано с применением высокопродуктивных штаммов микроорганизмов, созданием крупнотоннажных реакторов, разработкой максимально оптимальных способов и режимов культивирования, использованием для приготовления питательных сред белоксодержащего непищевого сырья различного происхождения, применением современных систем обработки данных и автоматизацией процесса культивирования.

ГЛАВА 3. Физико-химический и биологический контроль питательных сред

Задача данной монографии – информировать специалистов биологического профиля об основных методах и приемах оценки качества питательных сред для культивирования микроорганизмов. Пригодность питательных сред может быть определена только после контроля их качества физико-химическими и биологическими методами.

Методы физико-химического и биологического контроля качества питательных сред разрознены по многочисленным литературным источникам, учебникам и практикумам. Поэтому мы изучили имеющийся литературный материал и апробировали в лабораторных и производственных условиях методы контроля качества питательных сред, сосредоточив их, а также результаты собственных экспериментов в данной монографии.

Представленные в монографии методы определения качества питательных сред могут быть использованы в практической работе специалистами ветеринарных лабораторий, микробиологами в сфере производства биологических ветеринарных препаратов, сотрудниками научно-исследовательских и учебных учреждений.

Описанные в настоящей монографии методики не ограничивают творческой инициативы исследователей и практических работников. По мере накопления сведений о более достоверных методах контроля качества питательных сред и их компонентов, они могут уточняться и дополняться.

3.1. Определение рН

Концентрацию водородных ионов в пробах определяют потенциометрически, используя для этого различные типы отечественных и зарубежных приборов.

Определение величины рН проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к определенному типу рН-метра. Наиболее точные результаты могут быть получены при температуре $25 \pm 1,5^\circ\text{C}$.

3.2. Определение содержания азота методом Кьельдаля

Общий азот – это сумма азота белков, полипептидов, альбуминов, аминокислот, пептидов, солей аммония и др. Азот органических соединений при сжигании с концентрированной серной кислотой превращается в сернокислый аммоний, который при воздействии концентрированной щелочи разлагается с выделением аммиака. Количество образующегося аммиака можно определить различными методами (Неслера, Каннея и др.). Общепринятым является метод Кьельдаля.

Для его осуществления необходимы следующие реактивы: концентрированная серная кислота, 33%-ный пергидроль, 30%-ный раствор, титрованный раствор 0,1 Н серной кислоты, титрованный 0,1 Н раствор едкого натра, 0,1%-ный водный раствор метилоранжа, индикатор Таширо (смесь 0,2%-ного метилрога и 0,1%-ного метилового синего в соотношении 1:1).

Содержание общего азота определяют следующим образом. В Кьельдалевскую колбу из термостойкого стекла вносят 1 см³ питательной среды или 5%-ного раствора гидролизата, добавляют 1 см³ концентрированной серной кислоты и сжигают на песчаной бане с газовым или электрическим обогревом. Используемую пробу сжигают до полного обесцвечивания.

Выделяющийся аммиак отгоняют в круглодонную колбу (перегонная) емкостью 500-2000 см³, соединенную через стеклянную трубку с колбой Кьельдаля, которая соединена через каплеуловитель со стеклянным холодильником. Конец холодильника должен быть погружен в приемную колбу (колба Эрленмейера на 100-200 см³).

Минерализованный образец переносят из колбы для сжигания в колбу для отгонки путем обмывания первой небольшим количеством дистиллированной воды и добавляют несколько капель индикатора. Затем в колбу парообразователь наливают воды на $\frac{3}{4}$ ее объема. В приемную колбу отмеряют 10-20 см³ 0,1Н раствора серной кислоты. В колбу с пробой вносят 30%-ный раствор гидрат окиси натрия до щелочной реакции по индикатору. Колбу парообразователь нагревают на газовой горелке. Перегонку ведут до увеличения объема жидкости в колбе-приемнике в 2-3 раза. К отгону добавляют 2-3 капли индикатора Таширо и титруют 0,1Н раствором гидранта окиси натрия до перехода окраски от фиолетовой до зеленой.

Расчет количества общего азота ведут по формуле 1:

$$X = \frac{(AK_1 - BK_2) \times 1,4 \times 100}{V}, \quad (3)$$

где X – количество общего азота в мг %;

A – количество 0,1Н серной кислоты в см³;

B – количество 0,1Н раствора гидрата окиси, использованное для титрования в см³;

K₁ – поправка к титру 0,1 Н раствора серной кислоты;

K₂ – поправка к титру 0,1 Н раствора NaOH;

1,4 – количество азота в мг, эквивалентное 1 см³ 0,1 Н раствора серной кислоты;

V – объем пробы в см³, взятой для исследования;

100 – пересчет на 100 см³ исследуемого материала.

3.3. Определение остаточного азота

Под остаточным азотом понимают азот веществ, оставшихся в растворе после осаждения белков. Для определения содержания остаточного азота необходимы те же реактивы, что и для определения общего азота и 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Ход определения сводится к следующему.

В центрифужную пробирку вносят 5 см³ исследуемой пробы и 5 см³ 20%-ного раствора ТХУ, перемешивают, спустя 10 минут центрифугируют. Затем 2 см³ центрифугата вносят в колбу Кьельдаля, добавляют 1 см³ концентрированной серной кислоты и минерализуют как указано выше.

Расчет остаточного азота проводят по той же формуле, что и для общего азота (V пробы = 1 см³).

3.4. Определение содержания белка

Классический метод определения белка сводится к определению с соответствующим перерасчетом белкового азота как разницы между общим и остаточным азотом.

Расчет белка проводят по формуле 2:

$$X = \frac{(A - B) \times 6,25}{1000}, \quad (4)$$

где X – количество белка, г %.

A – содержание общего азота, мг %;

B – количество остаточного азота, мг %.

6,25 – коэффициент перерасчета азота в белок;

1000 – перерасчет, г %.

3.5. Определение аминного азота

Под общим амминным азотом понимают азот амминных групп низших полипептидов и аминокислот. В настоящее время существует два основных метода определения амминного азота: газометрический метод Ван-Слайка и метод формольного титрования Серенсена-Гаврилова. Наиболее простым и общепринятым является метод Серенсена-Гаврилова. Способ основан на блокировании формальдегидом в нейтральной среде свободных аминогрупп с последующим титрованием карбоксильных групп щелочью. Считают, что определяемое при этом количество карбоксильных групп эквивалентно количеству свободных аминогрупп.

Для постановки эксперимента необходимы следующие реактивы: 37%-ный формалин, нейтрализованный 0,1 Н раствором гидрата окиси натрия (50 см³ формалина + 1 см³ 0,5%-ного спиртового раствора фенолфталеина), 0,1Н титрованный раствор NaOH, 0,1 Н раствор серной кислоты.

Ход определения амминного азота заключается в следующем. В химический стакан вносят 1-2 см³ 2%-ного раствора гидролизата или такое же количество питательной среды и добавляют 15-20 см³ дистиллированной воды. Затем рН смеси доводят до 7,0 0,1 Н раствором щелочи или кислоты и вносят 2 см³ нейтрализованного формалина. Далее смесь титруют 0,1 Н раствором гидрата окиси натрия до рН 8,5.

Расчет содержания амминного азота в исследуемом образце ведут по формуле (3):

$$X = \frac{(A - B) \times K \times 1,4 \times 100}{V}, \quad (5)$$

где X – количество амминного азота в мг%;

A – количество 0,1 Н раствора NaOH в см³, пошедшего на титрование пробы;

B – количество 0,1 Н раствора NaOH, пошедшего на титрование контроля;

K – поправка к титру 0,1 Н раствора едкого натрия;

1,4 – количество азота в мг, эквивалентное 1 см³ 0,1 Н раствора едкого натрия;

V – объем пробы в см³, взятый на исследование;

100 – пересчет на 100 см³, пробы.

Параллельно проводят контрольное определение, расчет которого ведут по формуле 4:

$$X = \frac{A \times 1,4 \times K \times 100}{B}, \quad (6)$$

где X – содержание амминного азота в мг %;

A – разница между количеством 0,1 Н NaOH в см³, пошедшего на титрование испытуемого и контрольного раствора;

B – количество испытуемого раствора в см³, взятого на титрование;

K – поправка до точно 0,1 Н NaOH;

1,4 – эквивалент азота, соответствующий 1 см³ 0,1 Н NaOH;

100 – пересчет на 100 см³ пробы.

3.6. Количественное определение свободного триптофана по М.А. Пешкову

Определение триптофана чаще всего используют в биологической промышленности как тест на полноту ферментативного гидролиза мяса при изготовлении переваров Хоттингера. Установлено, что содержание триптофана по мере расщепления белков мяса возрастает до 350-400 мг%, по окончании гидролиза – стабилизируется (250-300 мг%), а затем

падает до 100-200 мг%.

Метод Пешкова основан на том, что при хлорировании триптофана образуется розовый монохлортриптофан. Реакцию считают законченной при исчезновении розовой и появлении желтой окраски.

Для определения свободного триптофана необходимы следующие реактивы: 1%-ный раствор хлорамина Б, который содержит 26-29% свободного хлора, ледяная уксусная кислота.

Прежде чем приступить к определению в пробе свободного триптофана, готовят 1%-ный раствор хлорамина Б. Для этого 1 г сухого хлорамина растворяют в 99 см³ воды и фильтруют. Затем в пробирку вносят 1 см³ питательной среды или 25%-ного раствора гидролизата, добавляют 4 см³ дистиллированной воды, 1 см³ ледяной уксусной кислоты и титрируют 15%-ным раствором хлорамина. Последний прибавляют по каплям, осторожно встряхивая во избежание образования пены, которая может мешать наблюдению за интенсивностью изменения окраски. Реактив добавляют до тех пор, пока розовая окраска не начинает ослабевать и переходить в желтую или грязно-бурую.

Содержание триптофана в питательной среде выражают в мг%, расчет проводят по формуле 5:

$$X = A \times 100, \quad (7)$$

где X – количество триптофана в мг%;

A – количество хлорамина в см³, пошедшее на титрование;

100 – перерасчет на 100 см³ раствора.

3.7. Определение содержания углеводов

Для определения содержания углеводов применяют коллометрический метод, основанный на реакции их с антроном в кислой среде с образованием соединения, окрашенного в голубовато-зеленый цвет (иногда желто-зеленый), интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию углеводов в пробе.

Для определения количества углеводов в пробе необходимы: 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, концентрированная серная кислота, антроновый реактив, представляющий собой смесь 34 см³ дистиллированной воды и 66 см³ концентрированной серной кислоты. В горячий раствор этой смеси вносят 50 мг перекристаллизованного антрона и 1 часть тиомочевины.

Перекристаллизацию антрона ведут по следующей методике. Антрон вносят в колбу с обратным холодильником и растворяют в спирте, доведенном до кипячения. На 100 г антрона берут 1000 см³ спирта. Раствор оставляют на сутки до выпадения вещества в осадок, затем спирт сливают. Осадок заливают новой порцией спирта и снова доводят до кипячения, отстаивают сутки, спирт сливают. Перекристаллизацию повто-

ряют еще раз, антрон переносят в химический стакан и высушивают методом сублимации.

Прежде чем приступить к определению углеводов в исследуемой пробе, готовят разведения стандартного раствора глюкозы для построения калибровочной кривой.

Схема приготовления разведений раствора представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Схема приготовления разведений раствора глюкозы

Объем стандартного раствора (см ³)	Объем воды (см ³)	Концентрация глюкозы (мг)
0,1	0,4	0,004
0,2	0,3	0,08
0,3	0,2	0,12
0,4	0,1	0,16
0,5	0	0,20

В каждую пробирку добавляют 1 см³ концентрированной серной кислоты и 2 см³ антронового реактива, выдерживают 10 минут в кипящей водяной бане, охлаждают и колориметрируют при длине волны в 30 нм, используя красный светофильтр в кюветах с рабочей длиной 5 мм.

Основной опыт по определению углеводов ставят в следующей последовательности. В центрифужную пробирку вносят 4,5 см³ 5%-ного раствора ТХУ и 0,5 см³ исследуемой пробы, перемешивают и центрифугируют. Из центрифужной в обычную пробирку отбирают 0,5 см³ надосадочной жидкости, добавляют 1 см³ концентрированной серной кислоты и 2 см³ антронового реактива, перемешивают и выдерживают в кипящей водяной бане 10 минут. Содержимое пробирки охлаждают и колориметрируют при тех же условиях, что и при построении калибровочной кривой.

Содержание углеводов рассчитывают по формуле 6:

$$X = \frac{A \times 10 \times 100}{0,5}, \quad (8)$$

где X – количество углеводов в мг%;

A – количество углеводов в мг, определенное по калибровочной кривой;

10 – коэффициент поправки на разведение образца;

0,5 – объем пробы в см³;

100 – пересчет на 100 см³ образца.

3.8. Биуретовая реакция

В пробирку вносят 2 см³ испытуемой питательной среды, добавляют 1,5-2 см³ раствора NaOH, хорошо перемешивают и осторожно наслаивают 4-5 капель 0,5%-ного раствора сернокислой меди. Окраска раствора должна быть красно-фиолетовой.

3.9. Определение содержания золы

В предварительно прокаленный тигель вносят 1-1,5 см³ исследуемой пробы питательной среды, выпаривают, а затем озоляют в муфельной печи при 500-600°С до постоянной массы.

Разница при последующих двух взвешиваниях должна быть не более 0,002 г. Содержание золы рассчитывают по формуле 7:

$$X = \frac{(M_2 - M) \times 100}{(M_1 - M)}, \quad (7)$$

где М – масса пустого тигля в г.;

М₁ – масса со средой до озоления в г.;

М₂ – масса тигля со средой после озоления в г.

3.10. Определение свободного индола

К 10 см³ испытуемой пробы добавляют 2-3 см³ амилового алкоголя, тщательно перемешивают, вносят 1 см³ раствора азотистокислого калия в разведении 1:1000, 1 см³ химически чистой серной кислоты и осторожно перемешивают. При этом не должно появиться розовое окрашивание, что является свидетельством отсутствия в среде индола.

3.11. Определение содержания тяжелых металлов

Для определения содержания тяжелых металлов 100 см³ питательной среды высушивают, затем прокаливают в тигле в присутствии серной кислоты и 1 см³ насыщенного раствора ацетата аммония. После озоления среду разбавляют и фильтруют через бумажный фильтр, тигель и фильтр промывают 5 см³ воды. К 10 см³ фильтрата, доведенного серной кислотой или раствором натрия гидроокиси до нейтральной или слабокислой реакции, прибавляют 1 см³ разведенной уксусной кислоты, 5 капель раствора сульфида натрия и перемешивают. В течение 5 минут не должно появиться осадка и желтого окрашивания.

3.12. Биологический контроль питательных сред

3.12.1. Тест-микробы, порядок хранения и работы с ними

Биологический контроль питательных сред проводят с использованием тест-микробов по следующим показателям: чувствительности, скорости роста, эффективности, стабильности.

Для определения этих показателей в практической работе применяют рекомендованные ФГУ Всероссийским государственным Центром качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ) следующие тест-микробы:

1. *Staphylococcus aureus* «Лоссманов»
2. *Escherichiae coli* 675
3. *Streptococcus faecalis* 6783
4. *Streptococcus pyogenes* Dick 1
5. *Shigella flexneri* 8516
6. *Corinebacterium diptheroides* 1911

Лиофилизированные культуры упомянутых бактерий хранятся при температуре 4-6°C. Восстановление культур из лиофилизированного состояния проводят в жидких питательных средах, применяемых для культивирования конкретного вида микроорганизмов. При определении биологических показателей используют штаммы, не подверженные диссоциации, для чего колонии тест-штамма рассматривают визуально и под малым увеличением микроскопа. Кроме этого, 1-2 млрд взвеси микробных тел агаровой культуры в физиологическом растворе кипятят на водяной бане в течение часа. На плотной питательной среде должны быть колонии только в S-форме, а взвесь тест-микроба после кипячения должна оставаться гомогенной. Проверенные культуры тест-штамма засевают в полужидкий агар, выращивают, набирают в пастеровские пипетки с перетяжками, запаивают с двух концов и хранят при 4-6°C 3-6 месяцев, используя по мере необходимости. Для биологического контроля используемых питательных сред применяют культуры тест-микроорганизмов, прошедшие не более 2 пассажей на рабочих средах.

3.12.2. Определение чувствительности, скорости роста

Под показателем чувствительности понимают десятикратное разведение культуры тест-микроорганизмов, при засеве из которого в питательных средах обнаруживают видимый рост бактерий.

Для определения чувствительности тест-штаммы выращивают на плотной питательной среде, смывают физиологическим раствором, готовят взвесь с содержанием 1 млрд микробных тел в 1 см³. Затем путем последовательного внесения 0,5 см³ взвеси в 8 пробирок с 4,5 см³ физраствора и тщательного перемешивания получают десятикратные разведения культуры. Из 4 последних пробирок (разведение 10⁻⁵-10⁻⁸) делают засева на плотную (в чашках Петри), в жидкую и полужидкую (в пробирках) питательные среды, используя не менее 3 чашек и пробирок на каждое разведение. Посевы выдерживают в термостате при температуре, оптимальной для каждого определенного вида тест-штамма.

Чувствительность среды определяют по наибольшему разведению культуры при высеве из которого на всех засеваемых средах (чашках, пробирках) визуально обнаруживают рост микробов. Среду считают качественной в отношении чувствительности при обнаружении роста в чашках и пробирках засеянных культурой тест-штамма, разведенной не менее чем 10⁻⁵. Скорость роста культуры микробов определяют для каждого разведения взвеси через 12-24-48 часов, выдерживая в термостате на плотных и 3-6-9 и т.д. до 48 часов в жидких и питательных полужидких

средах.

Показателем скорости роста является минимальное время инкубации (в часах), необходимое для появления видимого роста на всех засеянных средах.

При появлении роста через 24-48 часов на всех засеянных средах их признают качественными в отношении упомянутого показателя.

3.12.3. Определение показателя эффективности

Под показателем эффективности понимают выход микробных тел с 1 см³ среды в единицах оптической плотности.

Эффективность жидких питательных сред определяют по концентрации микробных тел через определенный срок инкубации, устанавливая изменения показателя оптической плотности (E) на ФЭКе при длине волны 620-640 нм в кювете с рабочей длиной 5 мм (ГОСТ 13805-76). Для оценки эффективности питательных сред ФГУ ВГНКИ рекомендует следующие значения для тест-культур:

Staphylococcus aureus «Лоссманов» – 0,4

Escherichia coli 675 – 0,5

Streptococcus faecalis 6783 – 0,3

Streptococcus pyogenes Dick 1 – 0,12

Shigella flexneri 8516 – 0,15

Corinebacterium diptheroides 1911 – 0,12

3.12.4. Определение стабильности основных свойств культур тест-штаммов

Стабильность основных свойств культур – это отсутствие в испытуемых питательных средах микроорганизмов, атипичных по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам и, напротив, наличие бактерий со свойствами, характерными для использованного тест-штамма.

Для определения стабильности в испытуемые жидкие, полужидкие и на плотные питательные среды делают посев бактерий определенного тест-штамма. После соответствующей инкубации изучают морфологические, культуральные и биохимические свойства выросших культур, используя при этом общеизвестные в микробиологической практике методики.

Испытуемую среду признают качественной при наличии в ней типичных для взятого в опыт вида бактерий и отсутствии их диссоциации.

ГЛАВА 4. Питательные среды для основных групп микроорганизмов

4.1. Среда для изоляции и идентификации энтеробактерий

Энтеробактерии широко распространены в природе. Средой их обитания является почва, вода, кишечник животных и человека. Энтеробактерий обнаруживают в продуктах питания, в кормах для животных. Среди них имеются патогенные, условно-патогенные и сапрофиты. Патогенные и условно-патогенные могут вызывать у животных и людей болезни, различающиеся по клиническим признакам и формам течения. Чаще всего инфекционную патологию у животных вызывают бактерии родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Yersinia*, значительно реже – энтеробактерии родов *Citobacter*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Serratia*, *Erwinia* и другие.

Бактерии всех родов семейства имеют сходство по морфологическим, культуральным свойствам и различаются по биохимическим признакам.

Энтеробактерии грамотрицательны, спор не образуют, капсул не формируют, за исключением отдельных сероваров, подвижны, но встречаются и неподвижные микроорганизмы. Все они хемоорганотрофы, негалофилы, хорошо растут на простых питательных средах. Оптимальная температура роста 37°C, оптимальное значение pH 7,2-7,4.

Для идентификации энтеробактерий широко используют определение их сахаролитических свойств.

Под сахаролитическими свойствами микробов понимают их способность расщеплять с помощью ферментов углеводы и многоатомные спирты. Для определения сахаролитических (гликолитических) свойств микроорганизмов их засевают на среды Гисса, среду Клигlera, агар Эндо, молоко с метиловым синим и многие другие.

В лабораторной практике для определения сахаролитических свойств микробов широко используют среды Гисса.

Для приготовления среды Гисса берут 10 г пептона и 5 г хлористого натрия, растворяют в кипящей дистиллированной воде, устанавливают pH 7,4, фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрат добавляют 0,25-0,5% соответствующего углевода и индикатор, разливают по пробиркам с поплавками (длина 25 мм, диаметр 3 мм). Разлитая по пробиркам среда сразу не заполняет всего поплавка. Заполнение его происходит во время стерилизации.

При изготовлении полужидких сред Гисса к определенному количеству дистиллированной воды добавляют 1% углеводов, 0,4% агар-агара. Стерилизуют 3 дня текучим паром по 30 минут или при 0,5 атм. - 15 минут.

Среду с рамнозой по Биттеру готовят и используют для дифференциации сальмонелл. В 1 л дистиллированной воды растворяют 0,5 г Na₂PO₄, 1 г (NH₄)₂SO₄, 2 г цитрата натрия, 5 г хлорида натрия, 0,05 г пептона и 5 г рамнозы. Кипятят, фильтруют, стерилизуют текучим паром 2 дня по 30 минут. К суточной культуре на этой среде прибавляют несколько капель 1,5% спиртового раствора метилового красного. В зави-

симости от степени кислотности среда краснеет или остается желтой. *Salmonella typhimurium* дает красное окрашивание, остальные сальмонеллы – желтое.

Среда Штерна предназначена для дифференциации сальмонелл. Ее готовят следующим образом. К 100 см³ МПБ прибавляют смесь из 5 капель насыщенного спиртового раствора основного фуксина и 2 см³ свежеприготовленного 10%-ного раствора натрия (Na₂S₂O₃), 1 см³ глицерина и 1 см³ 0,25%-ного раствора хризондина на стерильной горячей воде. Среду можно применять в течение 8-14 суток. Бактерии *S. typhimurium* вызывают покраснение сред, остальные сальмонеллы не изменяют ее цвета.

Для определения протеолитических свойств исследуемую культуру засевают на питательную среду, содержащую тот или иной белок: МПБ, пептонную воду, МПЖ, агар Клиглера, мозговую среду, молоко, желатин и другие. В ветеринарных лабораториях для определения протеолитической активности бактерий используют молоко, молоко с лакмусом, желатиновую среду.

Свежее молоко доводят до кипения и кипятят 5 минут, после чего оставляют в прохладном месте на сутки, а затем снимают жирный верхний слой. После удаления жирного слоя снова кипятят 5 минут, отстаивают сутки, снимают верхний слой, фильтруют через плотный ватно-марлевый фильтр 2-3 раза и нейтрализуют 10%-ным раствором карбоната натрия до pH 7,2. Молоко разливают по пробиркам и стерилизуют текущим паром 2 дня подряд по 30 минут. Протеолиз в молоке выражается растворением сгустка казеина.

Молоко с лакмусом готовят так же, как молоко без него, с той лишь разницей, что прибавляют 5-10% лакмусовой настойки и столько же 10%-ного раствора бикарбоната натрия. При кислотообразовании молоко становится розовым (до красного), при щелочеобразовании – синефиолетовым (до синего).

Способность микроорганизмов гидролизовать казеин определяют на молочном агаре Эймана: к 10 см³ стерильно расплавленного на водяной бане МПА добавляют 3 см³ стерильного обезжиренного молока, смешивают, разливают в чашки Петри и охлаждают. На поверхность питательной среды делают посев культуры с таким расчетом, чтобы получить отдельные изолированные колонии. Посевы культивируют в термостате 24-48 часов. Протеолиз проявляется пептонизацией казеина – вокруг колоний образуется четкая зона просветления молочного агара.

Кроме указанных сред для определения протеолитической способности микроорганизмов используют мясопептонную желатину. Для ее приготовления берут мясную воду и добавляют 1% пептона, 0,5% хлористого натрия и желатин, предварительно мелко нарезанный в количестве 10-20%. Для растворения желатина смесь нагревают до 40-50°C, постоянно перемешивая. После растворения желатина устанавливают pH 7,1-7,3 и прогревают в течение часа текущим паром. Среде дают отстояться и фильтруют через ткань, а затем стерилизуют текущим паром 2 дня по 20 минут. После стерилизации быстро охлаждают. Посев микробных культур делают уколом. Протеолиз выражается разжижением столбика желатины.

Для определения синтеза микробами сероводорода готовят и используют среду Черномордика: к 1 л дистиллированной воды добавляют 15 г пептона, 1 г лимонно-аммиачного железа, 1 г фосфата калия двузамещенного, 0,15 г гипосульфита и 5 г агара. Ингредиенты растворяют в кипящей воде, а затем разливают в пробирки и стерилизуют 30 минут при 0,5 атм. Посев производят уколом. В случае выделения сероводорода почернение распространяется от укола. Для определения способности утилизировать цитраты применяют среды Козера и Симмонса. Для приготовления среды Козера к 1 л дистиллированной воды растворяют 1,5 г фосфат натрия-аммония, 0,2 г сульфата магния, 3 г нейтрального цитрата натрия. Раствор разливают в пробирки по 5 см³ и стерилизуют 30 минут при 1 атм. По макровиду среда прозрачная. При росте цитрата симулирующих бактерий среда мутнеет. Кишечная палочка на этой среде не растет.

Для приготовления среды Симмонса в 1 л раствора Козера добавляют 20 г расплавленного агара, устанавливают рН 7,2, прибавляют 10 см³ спиртового раствора бромтимолового синего, фильтруют, разливают по пробиркам, стерилизуют 15 минут при 120°С и скашивают. Кишечная палочка на среде Симмонса не растет и не меняет ее цвета. Цитратассимилирующие бактерии хорошо растут, подщелачивают среду и вызывают окрашивание ее в синий цвет.

А.П. Шепелин (2013) на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ) предложил питательные среды: ГРМ-агар, Эндо-ГРМ-агар, Левина-ГРМ-агар, висмут-сульфит-ГРМ-агар.

ГРМ-агар имеет следующий состав (г/литр):

Панкреатический агар рыбной муки	24,0
Натрия хлорид	4,0
Агар	11,0

Эта среда предназначена для культивирования широкого спектра микроорганизмов. Она может быть использована в санитарных исследованиях воды, стоков и других материалов. При необходимости может быть обогатена углеводами, кровью, сывороткой крови и т.д.

В состав среды Эндо-ГРМ-агар входят следующие ингредиенты (г/литр):

Панкреотический агар рыбной муки	12,0
Экстракт пекарских дрожжей	1,0
Натрий хлористый	3,4
Д-(+)лактоза	10,0
Сульфат натрия безводный	0,8
Натрий фосфорнокислый двухзамещенный	
12водный	0,5
Фуксин основной	0,5
Агар микробиологический	10,0

Пропись среды Левина-ГРМ-агар представлена следующими составляющими в г/л:

Панкреатический агар рыбной муки	12,0
Экстракт пекарских дрожжей	1,0
Лактоза	10,0
Натрий фосфорнокислый двухзамещенный	0,7
Натрий хлористый	4,2
Эозин-Н	0,4
Метиленовый голубой	0,065
Агар микробиологический	9,0

Автором разработана питательная среда висмут-сульфит-агар следующего состава (г/л):

Панкреотический агар рыбной муки	24,0
Экстракт пекарских дрожжей	1,0
Натрий хлористый	2,0
Глюкоза	5,0
Натрий фосфорнокислый двухзамещенный 12водный	4,0
Висмут лимоннокислый	1,2
Натрия сульфат	4,0
Железа (II) сульфат	0,5
Бриллиантовый зеленый	0,01
Агар	13,0

4.2. Среды для анаэробных бактерий

Возбудителями анаэробных инфекций у животных и человека являются патогенные анаэробы. Это преимущественно клостридии, которые вызывают болезни под общим названием клостридиозы.

Клостридии характеризуются рядом общих особенностей:

- они устойчивы к неблагоприятным воздействиям внешней среды благодаря образованию спор;
- широко распространены в природе;
- обитают и размножаются в желудочно-кишечном тракте животных;
- палочки крупных размеров, грамположительны, подвижны;
- продуцируют высокоактивные токсины, которым принадлежит ведущая роль в патогенезе вызываемых болезней;
- растут на средах, обеспечивающих метаболизм в анаэробных условиях.

Анаэробные условия для культивирования анаэробов можно создать непосредственно в питательных средах или при помощи физических, химических, биологических и комбинированных методов защиты бактерий от кислорода атмосферного воздуха.

Наиболее широкое практическое применение в практике ветеринарных лабораторий получили следующие среды для анаэробов: жидкая среда Китта-Тароцци, казеиново-кислотная, казеиново-дрожжевая, мясо-казеиновая и другие. В качестве плотных питательных сред для культивирования анаэробов применяют кровяной агар с глюкозой по Цейслеру, среду Вильсон-Блэра, МПА с глюкозой. Из полужидких сред используют обычный мясо-пептонный полужидкий агар и полужидкий агар по Клодницкому.

Жидкие среды наливают в пробирки высоким столбиком и на поверхность наслаивают вазелиновое масло слоем 6-8 мм, которое предотвращает доступ атмосферного воздуха в среду. Для редукации и абсорбции кислорода в питательные среды вносят редуцирующие и легко окисляемые вещества: кусочки животных тканей (печень, яичный белок, мозг, мышцы, кровь), углеводы (глюкоза, лактоза), аскорбиновую и пиридиноградную кислоты, цистеин и др. (А.А. Солонко, А.А. Гласкович, В.Н. Алешкевич, Ф.Е. Тимофеев, Н.Х. Федосова, 2000).

Среда Китт-Тароцци. Для приготовления среды 1 часть печеночного отвара смешивают с 3 частями МПБ, нагревают до кипения, добавляют 1,25 г/л NaCl, устанавливают рН 7,6-7,8, кипятят 15 минут, фильтруют через бумажный фильтр. Кусочки печени массой 1-1,5 г в количестве 3-4 помещают на дно пробирок и заливают фильтратом. На поверхность среды наслаивают масло слоем толщиной до 1 см и стерилизуют при 0,5 атм. 30 минут.

Глюкозо-кровяной агар Цейслера. К 100 см³ расплавленного и охлажденного до 45°C 3%-ного обычного МПА добавляют 2% глюкозы и 15-20 см³ стерильной дефибринированной крови барана, можно коровы, кролика. Смесь осторожно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри. Агар можно использовать не только для культивирования анаэробов, но и определения гемолитических свойств других микробов.

Полужидкий агар для строгих анаэробов по Тароцци. В бульон Мартена (рН 7,2-7,4) с 0,3-0,5% глюкозы добавляют 0,1% агара. Разливают по 9 см³ в стерильные пробирки с кусочками вареного мяса, печени или стерильного мясного фарша.

Полужидкий агар по Клодницкому. В МПБ растворяют 0,5% глюкозы и 0,1% агара. Стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 минут.

Среда Вильсена-Блера. К 100 см³ 3% МПА с 1% глюкозы (рН 7,4) при температуре 60°C прибавляют 10 см³ 20% раствора сульфита натрия (Na₂SO₃) и 1 см³ 8%-го раствора хлорида железа (FeCl₂), приготовленного на стерильной дистиллированной воде. Раствор Na₂SO₃ стерилизуют 1 час текучим паром. Среду не стерилизуют.

Мозговая среда. Свежий мозг (не позже 24 часов после убоя животного) очищают от оболочек и жира, пропускают через мясорубку. Фарш мозга смешивают с водой в соотношении 2:1, добавляют 0,5% NaCl и помещают в аппарат Коха на 2 часа, затем расфасовывают в пробирки по 10 см³, наслаивают вазелиновое масло и стерилизуют при 110°C 2 часа.

Оригинальную среду на основе лактопептона для культивирования производственных штаммов *Cl. chauvoei* предложила И.В. Мотылева (1990). Вариант предложенной ею питательной среды имеет следующий состав: 1 часть печеночного экстракта, 3 части 2%-ного раствора лактопептона и 0,5% хлорида натрия. Перед засевом бактерий в реактор к среде добавляют 0,2% (в перерасчете на сухое вещество) 50%-ного стерильного раствора глюкозы. Так же автором приводится методика изготовления этой среды, которая заключается в следующем.

В 1 литре деминерализованной воды растворяется 20 г лактопептона сухого бактериологического, раствор доводится до кипения. Затем добавлением 10%-ного раствора соляной кислоты рН раствора снижается кратковременно на 10-15 минут до 5,0. После этого добавлением 10%-ного раствора NaOH рН корректируют до 7,9-8,0. К раствору лактопептона прибавляется одна часть печеночного экстракта. Смесь доводят до кипения. На 1 литр среды добавляется 5 г хлорида натрия и устанавливается рН 7,9-8,0. Среду в горячем виде фильтруют через бейтинг-ткань или пластинки марки «Ф» и стерилизуют при температуре 118-120°C в течение 50 минут. После стерилизации рН среды должен быть в пределах 7,4-7,6. Химические показатели качественной среды должны быть следующие: аминного азота - 110-120 мг%, триптофана - 50-75 мг%, пептона - не ниже 1,5%.

4.3. Среды для микроскопических грибов

Грибы – многочисленная группа микроорганизмов, имеющих эукариотический тип строения клеток. Эти микроорганизмы характеризуются выраженной дифференциацией вегетативного и репродуктивного мицелия, за исключением дрожжей, которые представляют собой одиночные клетки, не образующие типичного мицелия. У грибов более продолжительное время генерации и поэтому культивирование их является более длительным, чем других бактерий. Оптимальной для роста грибов является слабокислая реакция среды (рН 5,0-6,0) и температура в пределах от 28 до 30°C. У грибов часто проявляется неодинаковая потребность в разных источниках углерода для максимального роста мицелия, образования репродуктивных органов или определенных метаболитов. Это необходимо учитывать при конструировании питательных сред для этих микроорганизмов.

Среда Сабуро. Основой этой среды является дрожжевая вода. На 1 л водопроводной воды берут 80 г пресованных пекарских дрожжей (или 20 г сухих дрожжей), кипятят 15 минут, фильтруют через бумажный фильтр, разливают по флаконам и стерилизуют при 1 атм. 20 минут. К 100 см³ стерильной дрожжевой воды добавляют 1% пептона, 2% агара, нагревают до растворения агара, добавляют 4% глюкозы, фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют при 0,5 атм. 20 минут. После стерилизации среду в пробирках смешивают.

Солодовое сусло. Обычное сусло с пивоваренного завода, содержащее 10-15% сахара, имеющее плотность 16-18° по Биллингу фильтруют, разбавляют в 2 раза водопроводной водой, расфасовывают в пробирки или колбы и стерилизуют при 1 атм. 30 минут. На сусле можно готовить 2%-ный агар. Сусловый агар применяют для первичного выделения дерматофитов, дрожжевых грибов *Candida* и многих грибов-сапрофитов.

Среда Ван-Интерсона. Берут аммония азотнокислого 0,5 г, калия фосфорнокислого одноосновного 0,5 г и растворяют в 100 см³ водопроводной воды. Стерилизуют при 1 атм. 20 минут.

Среда Чапека. В 1 л воды растворяют натрия азотнокислого - 2 г, калия фосфорнокислого одноосновного - 1 г, магния сернокислого - 0,5 г, калия хлористого - 0,5 г, железа сернокислого - 0,0012 г, глюкозы - 30 г. Для приготовления агара добавляют 2,5% агара, расфасовывают по пробиркам и стерилизуют при 0,5 атм. 20 минут.

Среда Сабуро для хранения штаммов дерматофитов. В 100 см³ воды вносят 1 г пептона и 1,8 г агара. Автоклавируют при 1 атм. 20 минут.

4.4. Среды для микобактерий

Микобактерий относят к семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*, который включает большое количество видов.

Родовой признак микобактерий – кислото-, спирто- и щелочеустойчивость. Возбудители туберкулеза характеризуются выраженным полиморфизмом. Они имеют форму длинных, тонких (*M. tuberculosis*) или коротких, толстых (*M. bovis*), прямых или слегка изогнутых палочек с гомогенной или зернистой цитоплазмой. Микобактерии грамположительны, неподвижны, спор не образуют, имеют микрокапсулу. Возбудители туберкулеза характеризуются медленным ростом, требовательны к питательным средам. В жидких питательных средах растут на поверхности в виде сухой морщинистой пленки кремового цвета. На плотных средах отмечается рост в виде светло-кремового морщинистого, сухого чешуйчатого налета с неровными краями. По мере роста колонии преобретают бородавчатый вид (похожи на цветную капсулу).

Питательные среды для микобактерий должны обеспечивать их рост, способствовать максимально возможному сокращению срока размножения микроорганизмов, видимого визуально, положительно влиять на сохранение культуральных признаков, выращиваемого вида.

Требования, предъявляемые к питательным средам, для микобактерий сводятся к следующему:

- среды должны содержать необходимые для их роста жирные кислоты;
- в состав сред должен быть включен источник углерода, не идентичный для большинства патогенных бактерий, т.е. глицерин или крахмал, но не глюкоза;
- для повышения эффективности сред в их состав вводят активаторы роста микобактерий;

- питательные среды должны содержать набор солей, поддерживающий рост микобактерий и оптимальное значение рН среды.

Среда Прайса. Кровь кролика или барана смешивают с лимоннокислым натрием в соотношении 10см³ крови и 2см³ 5% цитрата. Цитратную кровь разводят стерильной дистиллированной водой из расчета на 1 часть крови 2-4 части воды. Среду расфасовывают в стерильные пробирки по 5 см³ и используют для посева.

Среда Левенштейна-Йенсена. Берут 600 см³ дистиллированной воды, содержащей 12 см³ глицерина, и растворяют аспарагина - 3,6 г, фосфата калия однозамещенного - 2,4 г, сульфата магния - 0,6 г, картофельной муки - 5 г, малахитового зеленого - 0,4 г. Полученную смесь стерилизуют в автоклаве 125 минут при 120°С. Затем готовят 1000 см³ однородной суспензии из свежих яиц, предварительно вымытых щеткой с мылом в проточной воде (приблизительно 20-25 минут), помещают в 70° спирт на 1-2 часа, разливают в стерильную круглодонную колбу с бусами (из каждого десятка яиц отбрасывают два белка). В яичную взвесь добавляют стерильно основной солевой раствор, подогретый до 45-60°С, тщательно перемешивают, избегая появления пузырьков воздуха, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, расфасовывают в пробирки и оставляют в наклонном положении при 85°С 45 минут.

Среда Петраньяни. В колбу со стеклянными бусами вносят 250 см³ коровьего молока, 16 г картофельной муки, 1 г пептона и одну картофелину средней величины, нарезанную на мелкие кусочки, и при постоянном помешивании колбу выдерживают 10 минут в кипящей бане, пока не образуется клейстер. Колбу оставляют в бане при 56°С на 1 час. Затем прибавляют 10 яиц, которые в течение 1 часа находились в спирте. После этого смесь размешивают, фильтруют через марлю, прибавляют 15 см³ 2%-ного водного раствора малахитового зеленого. Полученную среду фильтруют через двойной слой марли, разливают в стерильные пробирки и выдерживают для свертывания при 85°С 2 часа. В качестве конденсационной жидкости стерильно добавляют среду Сотона. Контрольную среду выдерживают в термостате в течение суток. Перед посевом в конденсационную жидкость добавляют раствор пенициллина.

Можно вместо малахитового зеленого прибавить смесь красителей. Отдельно готовят 0,2%-ные растворы нейтрального красного и малахитового зеленого в равном соотношении. К 100 см³ среды прибавляют 4 см³ смеси красителей. Цвет среды розоватый. Кислотоустойчивые сапрофиты меняют цвет среды на лиловый. Вирулентные и авирулентные туберкулезные микобактерии не вызывают изменение цвета среды.

Картофельно-глицериновая среда. Из тщательно вымытого и очищенного картофеля вырезают все глазки. Затем трубчатым сверлом, обработанным спиртом, вырезают цилиндрические куски, разрезают их по диагонали простерилизованным ножом, опускают на 2 часа в 1%-ный раствор бикарбоната натрия, а затем вымачивают 2 суток в 5-6%-ной глицериновой воде, кладут в широкие пробирки или пробирки с перетяж-

кой, наливают в них немного глицериновой воды и автоклавируют 20 минут при 120°C. Пробирки укладывают в наклонном положении поверхностью, предназначенной для посева, вниз, чтобы сохранить ее влажной.

Среда Р.А. Школьниковой. К подогретой дистиллированной воде в количестве 890 см³ в следующем порядке добавляют 1,5 г одноосновного фосфата калия, 2,5 г двухосновного фосфата натрия, 0,5 г сульфата магния, 1,5 г цитрата натрия, 0,5 г цитрата аммиачного железа, 80 см³ гидролизата казеина, 30 см³ глицерина химически чистого. Каждый ингредиент добавляют после растворения предыдущего. Среду фильтруют через бумажный фильтр и разливают по 2 см³ в пробирки. Среду автоклавируют при 120°C 30 минут.

Среда Сотона. Берут 4 г аспарагина, 60 см³ глицерина, 2 г лимонной кислоты, 0,5 г двухосновного фосфата калия, 0,5 г сульфата магния, 0,05 г цитрата аммиачного железа и доливают до 1000 см³ стерильной дистиллированной воды. Смесь разливают в пробирки, стерилизуют в автоклаве, доведя давление до 1 атм. и тут же выключив подогрев.

4.5. Питательные среды для микоплаз

Микоплазмы – прокариоты без клеточной стенки, роль которой у них выполняет трехслойная цитоплазматическая мембрана. Ввиду отсутствия клеточной стенки они чувствительны к осмотическому шоку. Для предотвращения лизиса в состав питательных сред вносят стабилизирующие соли и другие вещества. Кроме этого, микоплазмы для роста на питательных средах нуждаются в добавлении многих компонентов, которые они не способны синтезировать сами. Поэтому микоплазм невозможно вырастить на обычных средах. Для своего роста и размножения микоплазмы нуждаются в полноценном белке, холестерине, рибонуклеиновой кислоте, стеринах, витаминах, минеральных солях. В лабораторной практике применяют среды, обогащенные 20% сыворотки крови лошади или свиньи, 10% экстракта живых дрожжей и 1% глюкозы. Для большинства патогенных видов микоплазм температурный оптимум культивирования составляет 36-38°C. Оптимальное значение рН сред - 7,4-7,8. Посевы инкубируют в течение 5-10 суток. Для их культивирования применяют специальные питательные среды, состав которых и их изготовление приведены ниже.

Среда Мартена. Из свежих свиных желудков делают фарш и 250 г его суспендируют в 1 л теплой (50°C) кипяченой водопроводной воды, добавляют 10 см³ концентрированной соляной кислоты и тщательно перемешивают. Смесь в течение суток выдерживают при 45-50°C, периодически перемешивая, затем прогревают 30 минут текучим паром и оставляют для переваривания на 5 суток при 4°C. По истечении срока переваривания надсадочную жидкость декантируют, фильтруют через бумажный фильтр, расфасовывают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120°C.

Модифицированная жидкая среда ВИЭВ. Смешивают равные объемы среды Мартена и мясной воды, устанавливают рН 8-8,2 и стерилизуют 30 минут при 120°C. Перед использованием в среду добавляют 20% стерильной сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта и 0,5% глюкозы.

Среда Эдварда. Отвар сердечной мышцы в количестве 500 см³ смешивают с 500 см³ водопроводной воды и 10 г пептона. Доводят рН смеси до 8,4 и стерилизуют 30 минут при 120°C. Перед применением в среду добавляют 20% стерильной сыворотки крови лошади или крупного рогатого скота и 10% дрожжевого экстракта. При необходимости получения полужидкой или плотной среды Эдварда к жидкой среде добавляют, соответственно, 3 или 20 г агар-агара.

Для приготовления отвара сердечной мышцы к 1 литру дистиллированной воды добавляют 1 кг фарша мышцы сердца крупного рогатого скота и ведут экстракцию 16-18 часов, периодически перемешивая смесь. Затем кипятят 40 минут, отстаивают, надсадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат расфасовывают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120°C.

Для приготовления дрожжевого экстракта 50 г пекарских дрожжей суспендируют в 200 см³ дистиллированной воды, нагревают до закипания и пенообразования. Затем смесь охлаждают, центрифугируют, центрифугат стерилизуют фильтрованием. Экстракт пригоден в течение 14 суток.

Среда Надь-Погани. В литре дистиллированной воды растворяют 2,5 г натрия хлорида, 0,075 г пептона, 2,5 г гидрофосфата натрия, добавляют 1 см³ 2,4%-ного водного раствора фенолового красного, устанавливают рН 8,0-8,2 и стерилизуют 30 минут при 120°C. Перед использованием среды в нее вносят 200 см³ дрожжевого экстракта и 200 см³ стерильной сыворотки крови лошади.

Модифицированная плотная среда ВИЭВ. Среду Мартена и мясную воду смешивают в соотношении 1:1, и смесь добавляют к горячему 20%-ному агару с таким расчетом, чтобы концентрация агара была 1,5-2%. Затем среду разливают в колбы и стерилизуют 30 минут при 120°C. Перед применением среду охлаждают до 45-50°C, добавляют 10% дрожжевого экстракта, 20% стерильной сыворотки крови лошади и 0,5% глюкозы.

В природе существуют многие виды микоплазм и только лишь незначительную часть их удается вырастить на искусственных питательных средах. До сих пор не удалось вырастить *in vitro* ни одну из фитоплазм, поражающих насекомых и растения. Многие микоплазмы даже при использовании богатых питательных сред растут плохо, медленно. Это объясняют тем, что у микоплазм ограничены биосинтетические возможности. Поэтому для их культивирования готовят питательные среды сложного состава. Для роста и развития микоплазм нужны стеролы и жирные кислоты, источником которых является сыворотка крови животных. Попытки заменить сыворотку на чистые препараты стеролов и жирных кислот оказались безуспешными. Предполагают, что сыворотка содержит

белки, способные нейтрализовать токсичные для микоплазм соединения. Состав и количество компонентов сред для оптимального культивирования микоплазм значительно варьирует для разных их видов. Все компоненты сред предварительно проверяют по отсутствию токсичности и наличию способности вызывать рост микоплазм.

4.6. Питательные среды для кокковых форм микроорганизмов

Из всех кокковых форм микроорганизмов самыми неприхотливыми к питательным средам являются стафилококки. Они хорошо растут на простых питательных средах МПБ, МПА, рН сред - 7,0-7,4. Посевы инкубируют в течение суток. Однако для их выделения, культивирования и дифференциации используют желточно-солевой и солевой кровяной МПА, глюкозо-сывороточный бульон, селективную среду, содержащую кристаллвиолет и другие среды.

Для выращивания большинства патогенных кокков им необходимо создать условия, обеспечивающие потребности в питательных веществах, близких к естественным в организме. Поэтому питательные среды должны содержать ингредиенты животного происхождения: кровь, сыворотку крови, желчь и другие.

Сахарный бульон. Смешивают в одной бутылки 1 л перевара Хоттингера и 2 л мясной воды, прибавляют 0,5% хлорида натрия, подогревают до 80-90°C, устанавливают рН 8,0 и кипятят 30 минут. Отстаивают в темном месте 2 часа, фильтруют, расфасовывают. Бульон стерилизуют при 0,5 атм. 30 минут. К бульону прибавляют 40% раствор глюкозы с таким расчетом, чтобы в нем содержание сахара составляло 1-2%.

Сывороточный агар. К расплавленному и охлажденному до 45°C агару (рН 7,4) прибавляют 15-20% лошадиной или бычьей сыворотки, тщательно перемешивают, избегая образования пены, разливают по чашкам Петри.

Кровяной агар. К расплавленному и охлажденному до 45-50°C агару добавляют 5-10% дефибринированной или цельной свежезятой крови животного (барана, кролика, крупного рогатого скота). Агар с кровью тщательно перемешивают, избегая образования пены, и расфасовывают по чашкам Петри.

Шоколадный агар. К расплавленному 2% агару с 0,5% глюкозы (рН 7,4) прибавляют небольшими порциями при постоянном помешивании колбы с содержимым 8% дефибринированной крови барана (можно брать кровь других животных). Затем колбу слегка подогревают на слабом огне. Для подавления роста посторонней микрофлоры прибавляют водный раствор генцианового фиолетового в концентрации 1:50000. Шоколадный агар должен иметь светло-коричневую окраску.

Бульон Левинталя. В колбу вносят 100 г мясного фарша, 300 см³ дистиллированной воды, 10 см³ нормального раствора карбоната натрия (Na₂CO₂), хорошо перемешивают и оставляют в термостате на 1-2 часа. Затем прибавляют 0,5 г панкреатина, растворенного в 20-30 см³ воды с 2

см³ нормального раствора бикарбоната натрия, 10 см³ хлороформа и оставляют в термостате на сутки, при этом содержимое колбы как можно чаще перемешивают. Отдельно готовят 0,8% буферный раствор фосфата натрия в дистиллированной воде, подкисляют хлористоводородной кислотой до рН 5,6-6,0. После этого смешивают равные количества буферного раствора и мясной кашицы, кипятят, фильтруют, устанавливают рН 7,2-7,4, снова кипятят, разливают в пробирки и стерилизуют 2 дня текущим паром по 30 минут.

Молочно-солевой агар. В 100 см³ МПБ растворяют 6,5 г хлорида натрия, 20 г агара. Устанавливают рН 7,4, стерилизуют при 121°С 20 минут. Перед использованием агар расплавляют, охлаждают до 45°С, добавляют 10% стерильного обезжиренного молока и разливают по чашкам Петри. Эту среду применяют для определения пигментообразования и способности к росту при наличии 6,5% хлорида натрия.

Среда Чаплина-Бернса. К 100 см³ МПА добавляют 3,3 см³ 0,1%-ного водного раствора кристаллического фиолетового и 5 г лактозы. Устанавливают рН 6,8, стерилизуют автоклавированием 30 минут при 110°С. Колонии патогенных стафилококков растут быстрее, чем непатогенных, и приобретают фиолетовый или оранжевый цвет.

Глюкозо-сывороточный бульон. К свежему стерильному МПБ (рН 7,4-7,6) добавляют 10% нормальной инактивированной сыворотки крови лошади и 1% глюкозы. Сыворотку и глюкозу стерилизуют фильтрацией.

4.7. Среды для лептоспир

Литературные данные и практический личный опыт поддержания и культивирования производственных штаммов лептоспир, предназначенных для изготовления вакцин против лептоспироза, гипериммунных лечебных и диагностических сывороток, свидетельствуют, что эти микроорганизмы являются весьма прихотливыми к питательным средам.

Лептоспиры размножаются путем поперечного деления клетки. Продолжительность одной генерации у лептоспир значительно больше, чем у бактерий многих видов, и составляет в среднем 6-16 часов. Динамика размножения лептоспир в питательных средах подчиняется закономерностям, общим для большинства видов бактерий. Культивируют лептоспиры при температуре 28-30°С и значении рН 7,0-7,4.

При выделении культур из патологического материала большинство серовариантов бактерий дают видимый рост в течение первого месяца после высева, в некоторых случаях рост появляется через 2-3 месяца, а у лептоспир серогруппа *Sejroe*, *Hebdomadis* и *Mini* – 6 месяцев. Выращивают лептоспир в аэробных условиях.

Ю.А. Малахов (2001) рекомендует пересев свежевыделенных культур из патматериала проводить не реже одного раза в 10 дней до полной адаптации бактерий к питательной среде, о чем можно судить по накоплению лептоспир и их морфологии. Он же указывает, что производственные и диагностические штаммы, культивируемые в сывороточной среде, необходимо пересевать через 15-20 дней.

Впервые лептоспир выделили Inada, Ido, Hoki, Wani (1916), используя среду *Noguchi*. В последующие годы до настоящего времени предложено большое количество питательных сред для выращивания лептоспир. Практическое применение получили сывороточные, полусинтетические (твин-альбуминовые) и синтетические среды. По консистенции различают жидкие, полужидкие и плотные питательные среды.

К питательным средам предъявляют следующие общие требования:

- в применяемой для приготовления питательных сред сыворотке крови доноров не должно быть специфических антител;

- для приготовления сред применяют дистиллированную, бидистиллированную, деминерализованную воду и химические вещества только марки «ХЧ»;

- среда должна быть стерильной и прозрачной без посторонних частиц, кристаллов солей и т.д.;

- питательные среды должны содержать необходимые компоненты для роста и сохранения свойств лептоспир (морфология, накопление, иммуногенность, антигенная структура);

- при апробации питательных сред необходимо учитывать отсутствие в 5-7-дневной культуре самоагглютинации, лизиса, дегенеративных форм бактерий;

- для оптимального роста и развития лептоспир питательные среды должны иметь нейтральную или слабощелочную реакцию (рН 7,0-7,4).

Наиболее востребованными для производственных лабораторий являются сывороточные среды. Для их приготовления Ю.А. Малахов, А.Н. Панин, Г.Л. Соболева (2001) рекомендуют использовать сыворотку крови кроликов или овец. Сыворотка крови других видов животных (крупного рогатого скота, лошадей, свиней) обладает бактериостатическим и бактерицидным действиями по отношению к лептоспирам.

Среда Ферворга-Вольфа. Для приготовления среды берут 900 см³ дистиллированной воды и добавляют 0,5 г хлорида натрия, 1 г пептона (фирмы Дифко), 100 см³ маточной буферной смеси Зоренсона с рН 7,2-7,4. Смесь в колбе автоклавируют при 120°С в течение 30 минут. В пробирки с прозрачной средой добавляют по 0,5 см³ кроличьей сыворотки. Среду прогревают в водяной бане при 56-58°С в течение 30 минут. Для проверки стерильности среды пробирки с ней помещают в термостат на 3-5 суток, после чего проводят визуальный просмотр их. Среду считают стерильной в случае отсутствия видимого роста микроорганизмов и пригодной для применения.

Компонентом многих питательных сред для лептоспир служит буферная смесь Зоренсона. Поэтому мы приводим методику приготовления этой смеси, которая заключается в следующем. Для получения ее смешивают 720 см³ М/15 раствора Na₂HPO₄·2H₂O и 280 см³ М/15 раствора KH₂PO₄. Смесь хранят в холодильнике. В состав смеси Зоренсона входит рабочая буферная смесь, для приготовления которой берут 1 часть исходной М/15 молярной буферной смеси (Н,876 г Na₂HPO₄·2H₂O и 9,078г KH₂PO₄ в 1 литре бидистиллированной или деминерализованной воды) и добавляют 9 частей дистиллированной или деминерализованной воды,

доводят рН (7,2), стерилизуют при 0,8-1 атм. в течение 30 минут. Среды, изготовленные на фосфатном буфере, более стабильны по сравнению со средами, приготовленными без его использования.

Среда Кортгофа. К 500 см³ дистиллированной воды добавляют 0,40 г пептона Витте, 0,70 г хлорида натрия (NaCl), 0,01 г гидрокарбоната натрия (NaHCO₃), 0,02 г хлорида калия (KCl), 0,02 г хлорида кальция (CaCl₂), 0,09 г калия фосфорнокислого однозамещенного (KH₂PO₄), 0,48 г натрия фосфорнокислого двузамещенного (Na₂HPO₄·2H₂O). Раствор прогревают при 100°C в течение 20 минут, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и еще раз прогревают при 100°C в течение 30 минут. Затем раствор охлаждают и добавляют 8% свежей сыворотки крови овец. Сыворотку крови прогревают для разрушения антител при 65°C – 2 часа или 68°C – 1 час. Пептон Витте можно заменить пептоном Дифко.

Среда Флетчера. Для приготовления среды к 1 л дистиллированной воды добавляют 2 г агара Дифко и кипятят 30 минут, расфасовывают в пробирки по 5 см³, автоклавируют при 120°C 30 минут, охлаждают, добавляют в каждую пробирку по 0,5 см³ стерильной кроличьей или овечьей сыворотки, прогревают в водяной бане при 56-58°C в течение 30 минут. Стерильность среды проверяют путем выдержки ее при 37°C в течение 3-5 суток.

Установлено, что лучшими сывороточными средами являются среды с кроличьей сывороткой и витаминами. Например, в среду Кортгофа добавляют 1 мг витамина В₁₂ и 1 мг никотиновой кислоты на 1 л среды.

Накопление лептоспир в средах незначительно и достигает не более 100-200 млн в 1 см³, но в сывороточных средах лептоспиры сохраняют полноценную антигенную структуру и иммуногенность.

Полусинтетические и синтетические питательные среды. Лептоспиры могут расти на бессывороточных и безбелковых средах. Эти среды должны содержать буфер, неорганические соли, витамины (В₁ и В₁₂) и жирные кислоты. Наиболее доступные источники жирных кислот для лептоспир - водорастворимые липиды. Кстати, они наиболее эффективны и экономически доступны. Из водорастворимых липидов источником жирных кислот являются полисорбаты, к которым относят твин-20, твин-40, твин-60 и твин-80. Однако твины содержат определенное количество жирных кислот (например, твин 80 – до 3%), в связи с чем необходимо проводить их детоксикацию. Простейшим способом детоксикации твинов является добавление к питательной среде сыворотки крови или альбумина, но такую среду нельзя считать безбелковой.

Общепризнанным методом детоксикации является соединение твина с мелким порошком древесного угля, который хорошо адсорбирует все токсические примеси. Согласно Ю.А. Малахову, А.Н. Панину, Г.Л. Соболевой (2001), основной раствор полисорбата (твин-20, -40, -60, -80) готовят путем разведения 20 г отобранного полисорбата в 200 см³ дистиллированной воды при комнатной температуре и помешивают раствор до достижения совершенно однородной консистенции. В процессе перемешивания в него медленно добавляют 40 г активированного древесного

угля. Отношение твина к древесному углю может варьировать от 1:6 до 6:1. Медленное помешивание смеси продолжают 18 ч при температуре 22-25°C, после чего углю дают осесть в течение 18 ч при температуре 4°C. Раствор полисорбата осторожно отделяют от осадка древесного угля, затем центрифугируют при 10000 оборотов в минуту в течение 1 ч., а потом подвергают ультрафильтрации для удаления мелких частиц угля и хранят при – 20°C.

В безбелковых (синтетических) питательных средах жирные кислоты твина служат основным источником углерода и энергии, а NH_4Cl – источником азота для лептоспир. В случае отсутствия какого-либо компонента в среде, лептоспиры не растут. Витамины B_{12} и B_1 необходимы для развития бактерий и если какой-нибудь из витаминов отсутствует в среде, лептоспиры невозможно субкультивировать. Для роста и размножения лептоспир необходимы магний, марганец, цинк, натрий, кальций, железо. Это учитывают при конструировании синтетических сред.

Синтетическая среда Е. Шенберга. Эту среду готовят следующим образом. К 1 л дистиллированной воды добавляют 0,531 г натрия фосфорнокислого двузамещенного (Na_2HPO_4) 0,150 г сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,006 г сульфата железа (II) – аммония $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,004 г Ca^{++} , 0,010 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, 0,050 г твина-80, 0,200 твина-60, 0,200 г глицерина, 0,500 г L-аспарагина, 0,1 г витамина B_{12} и 0,001 г витамина B_1 , Ca^{++} берут в виде карбоната кальция и обрабатывают раствором соляной кислоты. Витамин B_1 добавляют асептически после стерилизации. Среду нагревают до кипения, фильтруют, расфасовывают и стерилизуют при 121°C в течение 15 минут, конечное значение рН 7,4-7,6. Детоксикацию проводят порошком древесного угля, как описано выше.

Синтетическая безбелковая среда (Tomey, 1974). Эту среду предлагают использовать для промышленного культивирования лептоспир. Компоненты среды готовят в виде концентратов, которые можно разбавлять при приготовлении среды. Предварительно готовят следующие ингредиенты:

1. Минимальная основная среда Игла, содержащая десятикратные (x10) концентрации компонентов, готовится путем растворения в дистиллированной воде следующих веществ (из расчета мг на 100 см³ воды): хлорид натрия (NaCl) – 6800,0; хлорид калия (KCl) – 400,0; натрий фосфорнокислый однозамещенный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) – 140,0; магний сернокислый ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 200,0; хлорид кальция безводный (CaCl_2) – 200,0; глюкоза – 1000,0; L-аргинин – 105,0; L-цистин – 24,0; L-гистидин – 31,0; L-глутамин – 292,0; L-изолейцин – 52,50; L-лейцин – 52,40; L-лизин – 58,0; L-метионин – 15,0; L- фенилаланин – 32,0; L-треонин – 48,0; L-триптофан – 10,0; L-тирозин – 36,0; L-валин – 46,0; холин-хлорид – 1,0; фолиевая кислота – 1,0; инозит – 2,0; никотинамид – 1,0; О-пантотенат кальция – 1,0; пиридоксаль HCl – 1,0; рибофлавин – 0,10; тиамин HCl – 1,0; фенол красный 10,0; NaHCO_3 – 2200,0.

2. Концентрат буфера на 1 л дистиллированной воды: Na_2HPO_4 – 16,6; KH_2PO_4 – 2.17г.

3. Концентрат солей на 1 л дистиллированной воды: NH_4Cl – 5,35 г; $\text{Mg Cl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ – 3,72 г; NaCl – 38,5 г.

4. Концентрат металлов в растворе из 99 мл дистиллированной воды и 1 мл 10%-ного раствора HCl : ZnSO_4 – 64 мг; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 48 мг; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 800 мг.

5. Концентрат витаминов на 1 л дистиллированной воды: B_1 – 320 мг, B_{12} – 320 мг.

6. Липидный концентрат готовят растворением твина-80 в дистиллированной воде с целью получения раствора, 100 мл которого содержит 10 г твина – 80.

Приготовление среды заключается в следующем. В ферментер «Нью-Бруневик» вместимостью 14 л вносят 5355 мл дистиллированной воды, а затем при перемешивании добавляют: бикарбонат натрия – 10 г; L-цистин – 1 г; глюкозы – 6 г; концентрат буфера – 192 мл; концентрат солей – 240 мл; концентрат металлов – 30 мл; среду Игла (x10) – 120 мл, концентрат витаминов – 3 мл. После этого добавляют смесь, состоящую из 60 мл 10%-ного раствора твина-80 и 60 г слабоосновной анионообменной смолы («Амберлит-15»). Перед использованием в этой смеси коммерческую анионообменную смолу промывают 50%-ным этанолом, затем – три раза горячей водой, а после – таким количеством гидроксида натрия, чтобы pH смеси стал примерно равным 7,4.

По завершении смешивания описанных ингредиентов смесь автоклавируют 45 мин. при 121°C . Ферментер охлаждают до 30°C , а pH содержимого доводят до 7,4 путем пропускания стерильного углекислого газа, засевают 500-600 мл культуры лептоспир и ведут выращивание бактерий при постоянно работающей мешалке (150 об/мин). Через 96 часов культивирования добавляют 50 мл водного 5%-ного раствора твина-80, 25 мл водного 4%-ного раствора хлорида аммония, 40 мл концентрата буфера и 40 мл раствора солей. Через 120 часов добавляют еще 50 мл водного 5%-ного раствора твина-80, 25 мл концентрата металлов, 25 мл водного 12%-ного хлорида аммония, 1 г L-цистина в 3 мл дистиллированной воды и 3 мл стерильно отфильтрованного концентрата витаминов.

При культивировании лептоспир серогрупп *Canicola* и *Icterohaemorrhagiae* в этой среде в течение 6-7 дней получают накопление $3,3 \times 10^9$ - 5×10^9 микробных клеток в 1 мл среды.

Альбуминовая среда ГНКИ. (М.А. Бабич, Ю.М. Дигальцев, А.С. Фомченко, 1965).

Среда включает следующие ингредиенты: 97% фосфатного буферного раствора 1/150M (pH 7,38) или воды; 2-2,5% стерильного 10%-ного раствора альбумина; 0,5-1% стерильного фактора роста. Буферный раствор или воду автоклавируют при 127°C в течение 1,5 ч. Альбуминовую фракцию получают из сыворотки крови овец. К сыворотке добавляют 1:1 насыщенный раствор сернокислого аммиака. Осажденные глобулины удаляют фильтрованием через бельтинг-ткань или центрифугированием. Затем сыворотку подкисляют соляной кислотой до pH 4,6-4,8 и добавляют до полного насыщения порошок сернокислого аммония. Выпавший беловатый солевой осадок концентрируют прессованием и очищают от

солей диализом в проточной воде. Раствор альбумина очищают центрифугированием и последующей фильтрацией вначале через пластины марки Ф, а затем - СФ. Стерильный альбумин фасуют во флаконы и хранят при температуре 2-4°C.

Фактор роста представляют собой нативный экстракт печени, к которому добавляют (мг на 1 л): хлористый магний - 25; хлористый марганец - 10; молибденовокислый натрий - 1; хлористый цинк - 2; карбамид - 10; никотиновая кислота - 2; калиевая соль индолуксусной кислоты - 1; витамин В₁ - 20; В₂ - 0,1; В₁₂ - 0,02. Фактор роста фильтруют через пластины СД и хранят при температуре 2-4°C.

Авторы установили, что лептоспиры дают в этой среде накопление в 2-3 раза большее, чем в сывoroточной питательной среде.

Избирательная среда с 5-флуороурацилом для выделения лептоспир (С. Rassel, Johnson, R. Palmer, 1987).

Аналогом пиримидина урацила является 5-флуороурацил. Было установлено, что пуриновые основания включаются в нуклеиновые кислоты лептоспир, а пиримидиновые не включаются и не оказывают на лептоспиры никакого действия. Известно, что 5-флуороурацил является ингибитором роста многих видов микробов, включая лактобактерии, эшерихии, микрофлору мочевыводящих путей и др. Хорошие результаты по выделению лептоспир из контаминированного материала авторы получили при добавлении 5-флуороурацила к плотной, полужидкой или жидкой среде в концентрации 200 и 400 мг/мл.

Элективная плотная среда для выделения лептоспир из молока и мочи (Thierman, 1981).

Среда содержит бычий сывoroточный альбумин и твин-80 по Элленгаузену и 1% агара. Среду вносят в чашки и хранят в холодильнике.

В состав полужидкой среды вносят 0,25% агара и 5-флуороурацил до концентрации 100 мг/мл.

Мочу и молоко разбавляют от 1:10 до 1:10⁴ и высевают на плотные и полужидкие среды. Лептоспиры легче выделяются из молока на плотной среде, из мочи - на полужидкой.

Усовершенствованная элективная среда для выделения лептоспир из контаминированного материала.

Среда содержит (г на 100 мл): глицерин - 0,10, хлорид кальция (CaCl₂·2H₂O) - 0,016, хлорид магния (MgCl₂·6H₂O) - 0,016, (ZnSO₄·7H₂O) - 0,004, основная жидкая твин-альбуминовая среда - 2,3, В₁₂ - 0,00002, сульфат магния (MgSO₄·4H₂O) - 0,001, сульфат меди (CuSO₄·5H₂O) - 0,00015, твин-80 - 0,15, пируват натрия - 0,20, ацетат натрия - 0,10, сывoroточный альбумин - 10,0, агар-агар - 1,0, свежеприготовленный сульфат железа (FeSO₄·7H₂O) - 0,01, актибион - 0,10, бацитрацин - 0,04, 5-флуороурацил - 0,25, неомицин сульфат - 0,002, полимиксин В - 0,0002, рифампицин - 0,01 (антибиотики берут в виде 10%-ных растворов в 1%-ном водном этаноле).

Смеси антибиотиков добавляют к питательной среде, содержащей 0,5-2% сывoroтки крови кролика и 0,1-0,3% агара.

Обычно сывороточные питательные среды применяют для культивирования штаммов лептоспир, используемых в диагностических исследованиях и при изготовлении биопрепаратов, синтетические – для выделения лептоспир, в основном серогрупп – *Hebdamadis*, *Sejroe*, *Mini*, из патологического материала, полужидкие – для сохранения штаммов лептоспир, плотные – для очистки контаминированных штаммов, изучения диссоциации лептоспир.

Сывороточная среда. Простейшей питательной средой для лептоспир является сывороточная среда. Она представляет собой смесь простерилизованной воды (дистиллированной, бидистиллированной или деминерализованной) с 5-10% асептически добавленной сыворотки крови кролика или овцы.

Среда Уленгута. Дистиллированную, колодезную или речную воду разливают в пробирки по 5 см³ и стерилизуют, охлаждают, добавляют в каждую пробирку по 0,5 см³ свежей кроличьей инактивированной сыворотки. Для проверки на стерильность среду выдерживают в термостате при 37°C в течение 3-5 суток.

Среда ВГНКИ. Берут 1-5 л М/150 буферной смеси Зоренсена (рН 7,2), вносят в бутылку с сифоном и стерилизуют в автоклаве при 0,8 атм. в течение 30 минут. К охлажденной смеси добавляют 5-7% инактивированной сыворотки крови кролика или барана до концентрации белка в среде 0,22-0,25%, а также витамина В₁₂ - до 400 мкг/л и 65%-ный раствор витамина В₁ - до 0,5 мг/л среды. После добавления ингредиентов среду стерилизуют через стерилизующие пластины фильтра Зейтца и разливают в стерильные пробирки по 5-10 см³ или во флаконы. Среду проверяют на стерильность путем выдерживания ее при температуре 37°C в течение 3 суток и до 10 дней при комнатной температуре. Среду без визуальных признаков роста микрофлоры считают пригодной для культивирования лептоспир.

Плотная среда Кокса. К 90 см³ дистиллированной воды добавляют 1 г агара Дифко, 0,2 г триптозосолевого бульона Дифко и нагревают в водяной бане до их расплавления, разливают во флаконы и стерилизуют при 120°C в течение 15 минут, охлаждают до 45-50°C, добавляют 10 см³ инактивированной сыворотки крови кролика и 1 см³ 5-10%-ного раствора гемоглобина, разливают в чашки Петри по 40 см³, выдерживают для проверки на стерильность 24 часа при комнатной температуре, после чего среду считают готовой к применению.

4.8. Среды для бордетелл

Бордетеллы представляют собой небольшие подвижные граммотрицательные, коккообразные палочки. Они не образуют спор и капсул, являются облигатными аэробами, хорошо растут в жидких и на плотных питательных средах. Для бордетелл характерно полное отсутствие активности к сахарам и многоатомным спиртам. Видовым признаком этих микроорганизмов является образование термолабильного экзотоксина.

Для культивирования бордетелл применяют сывороточный бульон, кровяной агар, казеиново-угольный агар и другие среды. Оптималь-

ное значение рН сред - 7,0-7,2, продолжительность культивирования - 24-48 часов.

Молочно-кровяной агар. К 1000 см³ водопроводной воды добавляют 10 г натрия хлорида и 40-45 г сухого питательного агара. Кипятят до полного растворения агара и добавляют 1000 см³ обезжиренного молока. Подогревают до 65-70°C, тщательно перемешивают и прогревают текущим паром 30-40 минут. Разливают по флаконам и стерилизуют при 115°C 20 мин.

Перед применением к расплавленному и остуженному до 45-60°C агару добавляют 20% дефибрированной крови барана или лошади. Разливают по чашкам.

Кровяной агар. В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют при кипячении 10 г пептона, 3 г натрия хлорида, 2 г гидрофосфата натрия, 6 г мясного экстракта, 25 г агара. Разливают по флаконам, стерилизуют при 115°C 30 мин. Остужают до 45-50°C, добавляют 5-10% дефибрированной крови и разливают по чашкам.

Сывороточный бульон. К 250 см³ свежеприготовленного мясо-пептонного бульона (рН 7,6) добавляют 500 см³ сыворотки крови лошади или телят. Инактивируют при 56°C 30 мин. К полученному раствору асептически добавляют 750 см³ мартеновского бульона.

Пенициллин-нитрофурантоиновый агар Мак-Конки. К 1000 см³ расплавленного и остуженного до 45-50°C агара добавляют 100 мг фурантоина и 10000 ИЕ пенициллина, растворенных в 5 см³ стерильной дистиллированной воды. Готовую среду расфасовывают по чашкам или пробиркам.

Казеиново-угольный агар. К 500 см³ дистиллированной воды добавляют 18,6 г гидролизата казеина, перемешивают и доводят рН до 7,0. Количество добавляемого гидролизата казеина может варьировать с учетом того, что в готовой среде должно содержаться 150-170 мг% аминного азота.

В полученный раствор вносят 8,5 г натрия хлорида, 0,5 г КН₂Р₀₄, 0,4 г или 2 см³ 20%-ного раствора MgCl₂, 1,5 г крахмала (предварительно растворенного в небольшом количестве теплой воды), 0,01 г или 1 см³ 1%-ного раствора FeSO₄, 0,005 г или 1 см³ 0,5%-ного раствора CuSO₄, 0,003 г или 2 см³ 1,5%-ного раствора цистеина или цистина, 100 см³ дрожжевого диализата. Затем добавляют 25 г набухшего агара, доводят объем смеси дистиллированной водой до 1 л и подогревают до кипения. Устанавливают рН 7,3, добавляют 2 г активированного угля, разливают по флаконам и стерилизуют 30 мин. при 110°C. Горячую среду тщательно встряхивают для равномерного распределения угля и разливают по пробиркам и чашкам. Вторичное нагревание застывшей среды нежелательно, так как разрушается цистеин. Готовая среда черного цвета.

Среда Гартоха. Цельное молоко кипятят 5 минут и на сутки оставляют в прохладном месте. Образовавшийся верхний жирный слой снимают.

К 1 л водопроводной воды добавляют 10 г натрия хлорида и 40 г агара. Кипятят до полного растворения агара и добавляют равный объем молока. Подогревают текущим паром до 65-70°C, перемешивают, фильтруют через марлю и стерилизуют 20 мин. при 110°C.

ГЛАВА 5. Питательные среды для исследования некоторых видов патматериала

В практической микробиологии при посеве конкретного биоматериала (гноя, кровь, моча, мокрота и т.д.) выбор среды имеет большое значение, обуславливающее получение объективной информации, от которой зависит эффективное проведение санитарно-ветеринарных и лечебных мероприятий.

При выборе питательных сред для посева отдельных субстратов учитывают их общепризнанную классификацию:

- транспортные среды;
- среды общего назначения, обеспечивающие рост широкого круга микроорганизмов;
- селективные питательные среды;
- дифференциально-диагностические питательные среды;
- селективно-диагностические питательные среды, сочетающие свойства двух предшествующих;
- среда для безусловно анаэробных бактерий;
- среды для длительного хранения микроорганизмов.

Данная классификация имеет некоторые недостатки. Известно, что многие анаэробы могут расти на средах общего назначения, а на средах для анаэробов могут культивироваться факультативные анаэробы и аэробы. Однако считают, что приведенная классификация является принципиально верной, т.к. она позволяет представить адекватную схему для каждого вида патматериала и выделить в группе однотипных сред наиболее подходящие и эффективные.

Выбор питательных сред для посева биоматериала, определяется прежде всего характером микроорганизма, являющегося возбудителем болезни. Инфекционную патологию могут вызывать многочисленные микроорганизмы, но всегда существует достаточно очерченный круг микробов, которые играют доминирующую роль при определенной патологии той или иной локализации, что определяет выбор потенциально адекватных питательных сред, обеспечивающих рост предполагаемых возбудителей в минимально короткие сроки без изменения их биологических свойств.

При возникновении болезни клиническая картина ее проявления позволяет предполагать диагноз, который сужает круг возбудителей и, следовательно, выбор соответствующих для лабораторной диагностики питательных сред.

На рисунке 7 приведена принципиальная схема, отражающая последовательность применения питательных сред при бактериологическом исследовании (по М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич, 2008).

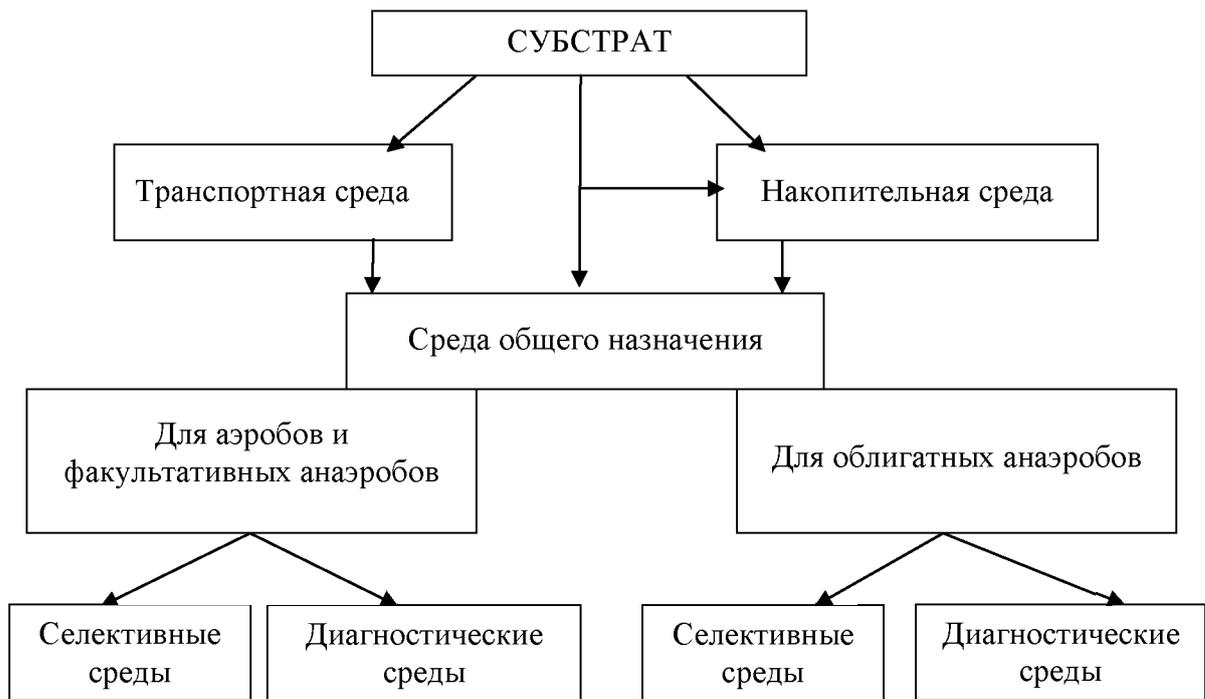


Рисунок 7 - Принципиальная схема последовательного использования питательных сред в клинической микробиологии

5.1. Питательные среды для посева крови

Одним из важнейших материалов, поступающих для исследования в микробиологическую лабораторию, является кровь. Известно, что в норме кровь стерильна, поэтому выделение гемокультуры имеет принципиальное значение для диагностики, в частности, таких состояний, как эндокардит, тифопаратифозные заболевания и сальмонеллезы, пневмонии, осложненные нагноением и другие. Ввиду того, что концентрация микроорганизмов в крови при бактериемиях, как правило, невысокая. Для посева необходимо брать достаточно большое количество крови. Естественная бактерицидная или бактериостатическая активность крови, наряду с предшествующей антибиотикотерапией, могут быть причиной отрицательного или несвоевременно полученного положительного результата исследования на гемокультуру. Соответственно, для инактивации бактерицидных свойств крови и обеспечения роста бактерий в качестве нетоксичного антикоагулянта можно применять натрия полиэтанолсульфонат. Это вещество подавляет активность стрептомицина, полимиксина, канамицина и гентамицина.

Посев крови и выделение гемокультуры имеет большое значение при тяжелых формах инфекционной патологии, вызываемой такими микроорганизмами, как стафилококки (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. albus*, *S. saprophyticus*), энтерококки (*E. faecalis*, *E. faecium*), эшерихии, клебсиеллы, бактероиды, анаэробные кокки, дрожжеподобные грибы и другие бактерии.

Обычно первичный посев крови проводят на жидкие питательные среды, а затем используют среды, как указано на рисунке 8, к которому

приводятся пояснения, включающие основные питательные среды для посева крови и выделения гемокультуры (по М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич, 2008).

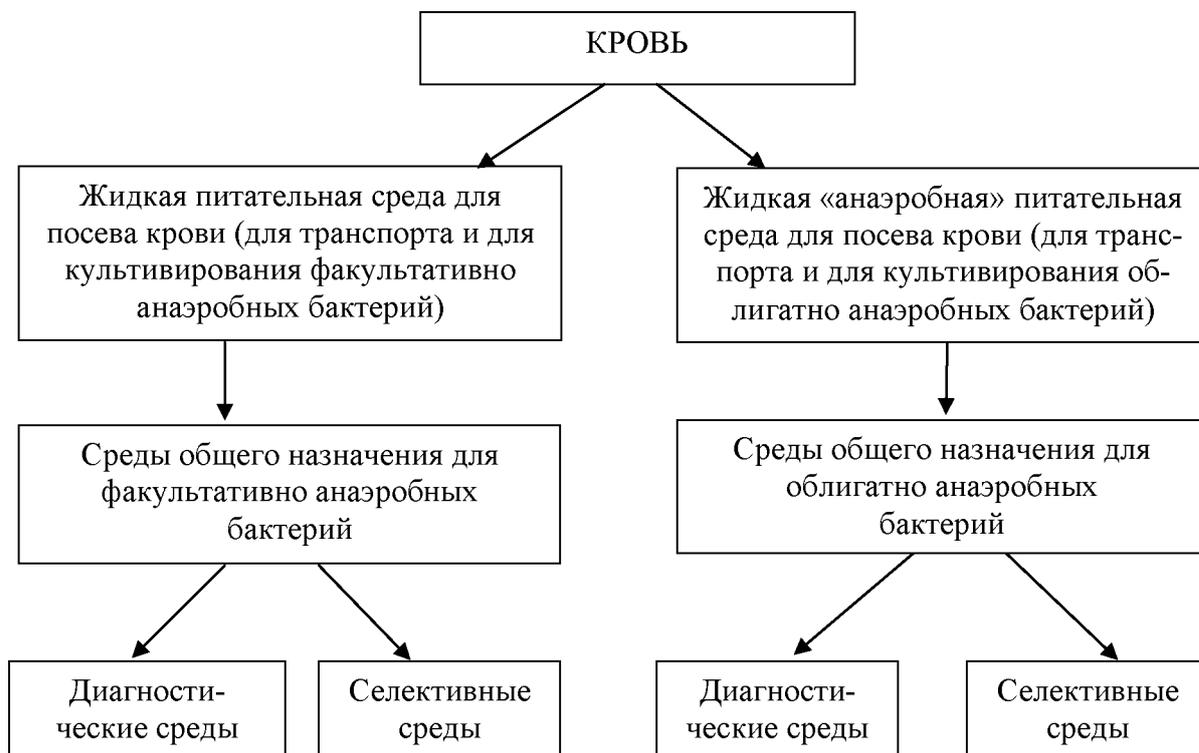


Рисунок 8 - Схема использования питательных сред для посева крови и выделения гемокультуры

В зарубежной практике широко используют среду Американской коллекции типовых культур (АТСС) следующей прописи (г/литр):

Панкреатический перевар казеина	17,0 г
Папайновый перевар соевой муки	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия фосфат двузамещенный	2,5 г
Глюкоза	2,5 г
Дрожжевой экстракт	0,4 г
Агар-агар	18,0 г
рН 7,5±0,2 при 25°C	

Этот вариант среды рекомендуют использовать при неустановленной принадлежности микроба и ассоциации микроорганизмов, т.е. как среду с высоким ростовым потенциалом.

Для выделения гемокультуры и роста других микроорганизмов считают эффективной среду следующего состава (в граммах на литр):

Панкреатический перевар казеина	18,0 г
Панкреатический перевар соевой муки	3,0 г
Глюкоза	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия фосфат двузамещенный	2,5 г
рН 7,2±0,2	

За рубежом востребованным для выделения гемокультуры является фенилэтанол агар (PEA-агар), Колумбийский агар, плотная среда Шедлера.

Рецептура PEA-агара включает (на литр):

Панкреатический перевар казеина	15,0 г
Перевар соевой муки	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Фенилэтиловый спирт	2,5 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,1-7,5 при 25°C	

Высокоэффективной средой для выделения и культивирования гемокультур считают Колумбийский агар, который представлен следующей рецептурой (в граммах на литр):

Панкреатический перевар казеина	12,0 г
Пептон	5,0 г
Мясной экстракт	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г.
Крахмал	1,0 г.
Агар-агар	13,5 г
pH 7,3±0,2 при 25°C	

Весьма обогащенным и ориентированным на выделение из крови облигатных анаэробов является агар Шедлера. Его состав в граммах на литр следующий:

Панкреатический перевар казеина	8,2 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Пептон	2,5 г
Перевар соевой муки	1,0 г
Глюкоза	5,8 г
Трис-буфер	3,0 г
Натрия хлорид	1,7 г
Двузамещенный фосфорнокислый калий	0,8 г
L-цистин	0,4 г
Гелин	0,01 г
Витамин K ₁	0,5 г
Агар-агар	13,5 г
pH 7,6±0,2	

Для выделения из крови аэробных микроорганизмов предложены жидкие питательные среды: триптон-соевый бульон с 10% сахарозы, сердечно-мозговой бульон, сахарный бульон.

В состав триптон-соевого бульона с 10% сахарозы входят (г/литр):

Ферментативный гидролизат казеина	17,0
Папаиновый перевар соевой муки	3,0
Дрожжевой экстракт	2,5
Натрия хлорид	5,0
Сахароза	100,0
Глюкоза	2,5
Калия гидрофосфат	2,5
Нитрия полианетолсульфонат	0,5
Гемин	0,005

Сердечно-мозговой бульон включает (г/литр):

Панкреатический перевар желатина	17,5
Настой мозга и сердца порошок)	17,5
Протеозопептон	2,0
Натрия гидрофосфат	2,5
Натрия полианетолсульфонат	0,25
Натрия хлорид	0,39
Глюкоза	0,16
pH 7,4±0,2	

Сахарный бульон представляет смесь следующих ингредиентов (г/литр):

Ферментативный гидролизат казеина	10,0
Глюкоза	5,0
Натрия хлорид	5,0
Натрия полианетолсульфонат	0,5
pH 7,3±0,2	

Для изоляции из крови анаэробных микроорганизмов применяют тиогликолевый бульон (г/литр):

Ферментативный гидролизат казеина	15,0
Дрожжевой экстракт	5,0
Глюкоза	5,0
Натрия хлорид	2,5
L-цистин	0,5
Натрия тиогликолят	0,5
Натрия полианетолсульфонат	0,5
pH 7,2±0,2	

В перечень базовых сред, рекомендованных ВОЗ для селективного выделения из крови и дифференциации энтеробактерий, входит среда МакКонки (предложена более 100 лет назад английским микробиологом МакКонки). Эта среда включает определенное количество желчных солей, сахара, индикатора, пептона в зависимости от количества желчных

солей рост грамположительных бактерий может ограничиваться или полностью подавляться. В эту среду добавляют кристаллический фиолетовый, который ингибирует рост энтерококков.

Кроме указанных выше сред, в отечественной практике используют такие среды, как среда Эндо, среда Левина и другие.

5.2. Питательные среды для исследования мочи

При лабораторной диагностике многих инфекционных болезней бактериальной этиологии посев мочи является распространенным бактериологическим исследованием. Медицинские специалисты считают, что если число микробных клеток в 1 см³ мочи достигает 5000 КОЕ, то это свидетельствует о развитии инфекционного процесса в организме. Повторное или трехкратное выделение микроба из мочи в количествах более 10³ КОЕ/см³ указывает на его этиологическую роль в возникновении инфекции.

При острых воспалительных процессах мочевыводящих путей, а также многих органов и тканей, из мочи выделяют *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Staphylococcus* и других. В случае соответствующей инфекционной патологии в моче могут быть обнаружены микобактерии, микоплазмы, уреоплазмы, гонококки и другие бактерии.

Существенным поводом для выбора питательной среды и посева мочи может служить микроскопия препарата-мазка, сделанного из нее и окрашенного по Граму. Важным основанием для выбора среды являются клинические признаки болезни и поставленный с учетом их предварительный ориентировочный диагноз.

Большинство авторов предлагают делать посев мочи на универсальную для этой цели среду - кровяной агар. По мнению всех микробиологов, обязательным является применение дифференциально-диагностической среды для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в качестве которой предлагают среду Эндо, среду Левина, среду МакКонки. Для выделения микроскопических грибов целесообразно применение плотной среды Сабуро, а для изоляции из мочи сальмонелл рекомендуют использовать тетратионатные среды.

В США для изоляции сальмонелл из пищевых продуктов, мочи, кала и других субстратов используют среду следующего состава (в граммах на литр среды):

Натрий серноватистоокислый	3,0 г
Кальций углекислый	10,0 г
Перевар казеина ферментативный	2,5 г
Пептон	2,5 г
Соли желчных кислот	1,0 г

Раствор йодистых препаратов 20,0 см³. (содержит 6,0 г, йода кристаллического и 5,0 г йодистого калия).

Схема выбора питательных сред для посева мочи, применяемых в микробиологической практике, представлена на рисунке 9.



Рисунок 9 - Схема выбора питательных сред для посева мочи

5.3. Питательные среды для выделения инфекта при болезнях органов дыхания

Вызвать патологию органов дыхания могут многочисленные микроорганизмы, поэтому выбор питательной среды для выделения их из биосубстратов весьма затруднителен. Необходимо иметь в виду, что патология респираторного тракта многообразна, при этом велика роль обсемененности патматериала нормальной микрофлорой и не всегда возможно провести грань между возбудителем и контаминирующим микробом. Патогенные и условно-патогенные бактерии могут вызывать фарингит, ларингит, трахеит, бронхит, пневмонию, абсцесс легкого, бронхоэктазы и другие патологические процессы, связанные с органами дыхания.

Например, возбудителями фарингита могут быть стрептококки группы С, арканобактерии, коринебактерии, гонококки, микоплазмы и некоторые другие.

При трахеобронхитах и бронхитах удается выделить таких возбудителей, как *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. Influenrae*, *S. aureus*, *B. pertussis*, *M. pneumoniae*. Кроме этого изолируют эшерихий, клебсиелл псевдомонад, грибов рода *Candida*, синегнойную палочку.

При асцедирующей пневмонии и абсцессах легко обнаруживают облигатно анаэробных бактерий: бактериоидов, фузобактерий.

При тяжелых осложненных формах бронхоэктазов доминируют *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. maltophilia*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *S. aureus* и другие микробы.

Исходя из далеко не полного приведенного перечня микроорганизмов, способных вызывать инфекционную патологию органов дыхания, можно констатировать, что выбор сред для их выделения и типирования представляет собой довольно сложную задачу.

При фарингитах рекомендуется схема использования питательных сред, представленная на рисунке 10.

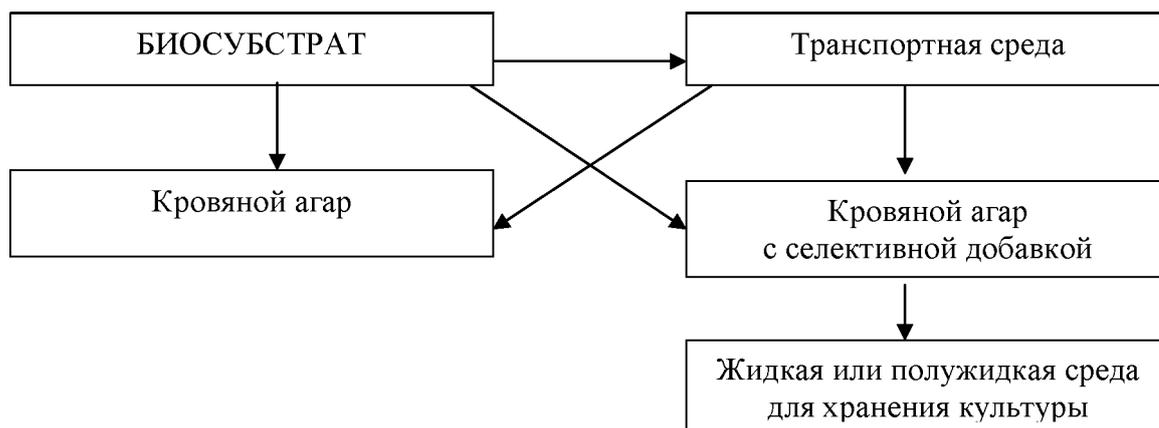


Рисунок 10 - Схема использования питательных сред при фарингите

В качестве транспортной среды используют среду Эйсмана (без добавления угля).

Чаще всего при фарингитах выделяют стрептококков и для их хранения можно использовать мясопептонный бульон с добавлением 1% глюкозы и 0,1-0,3% агар-агара. Выросшие на этой среде стрептококки хранят в холодильнике при 2-8°С.

Для выделения бактерий при фарингитах используют кровяной агар, т.е. обычный МПА с добавлением 5% бараньей крови. ВОЗ рекомендует применять среду Тейера-Мартина, представляющую собой модифицированный вариант шоколадного агара, в составе которого стимуляторы роста стрептококков (цистин, тимин, аденин и др.), а также ингибиторы роста сопутствующих микроорганизмов (нистатин, колистин, триметоприм и другие).

При острой пневмонии используют среды, представленные на рисунке 11.

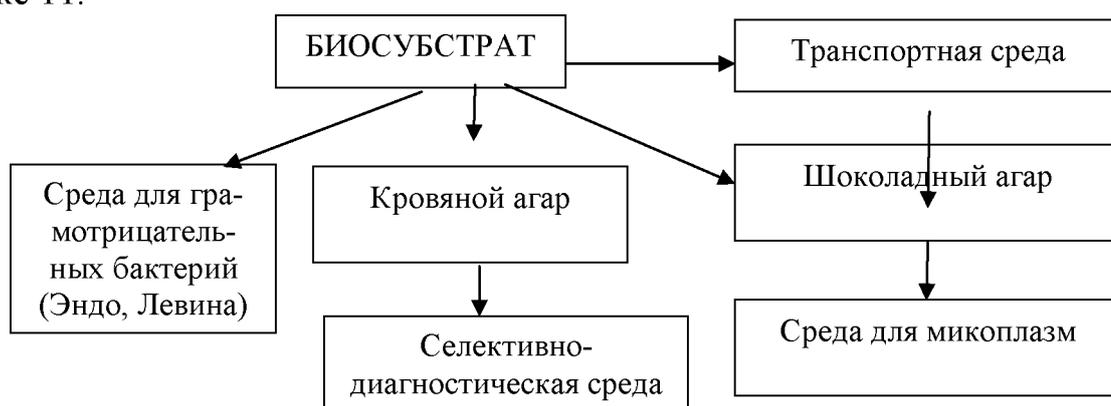


Рисунок 11 - Схема использования питательных сред при острой пневмонии

При абсцессах легкого и аспирационной пневмонии для посева биосубстрата применяют среды, представленные на рисунке 12.



Рисунок 12 - Среды для посева биосубстрата при абсцессе легкого и аспирационной пневмонии

Среды для посева патматериала при абсцессах легкого и аспирационной пневмонии.

В качестве основы для посева биосубстрата применяют кровяной агар, казеиново-соевый агар, Колумбийский агар и другие плотные среды.

Шоколадный агар предназначен для изоляции в первую очередь *H. influenzae*.

Для выделения грамотрицательных бактерий используют среду Эндо, среду Левина, агар МакКонки.

Для изоляции грамположительных бактерий рекомендуются электро-солевой агар или любая среда с ингибитором грамотрицательных бактерий.

Рост облигатно анаэробных бактерий может быть получен на агаре Шедлера, Колумбийском агаре, агаре для бруцелл.

Питательные среды для облигатно анаэробных микроорганизмов довольно сложны в изготовлении. Они многокомпонентные и при их получении необходимо строго соблюдать требования к качеству исходных ингредиентов и их соотношению в составе среды.

Приготовленные среды должны иметь определенное значение pH. Среды необходимо защищать от высыхания и воздействия прямых солнечных лучей. Их нельзя повторно разогревать или автоклавировать.

5.4. Среды для изоляции патогенов при заболеваниях органов пищеварения

Диагностике заболеваний желудочно-кишечного тракта посвящено громадное количество работ. Посев патматериала при патологии органов пищеварения относят в практической микробиологии к числу приоритетных, наиболее частых исследований, что объясняется той ролью, которую играют патогенные и условно-патогенные микроорганизмы в этиологии возникновения различных воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта.

М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич (2008) констатируют: «И нормальная, и болезнетворная микрофлора желудочно-кишечного тракта разнообразна. Ее представители отличаются по многим признакам, в том числе требуемыми условиями культивирования. Метаболизм одной группы микробов резко отличается от метаболизма другой. А это самым непосредственным образом влияет на выбор питательных сред для посева и последующей работы с микробом».

Предполагаемый диагноз значительно влияет на выбор питательных сред для посева биосубстрата. Многообразие микробного мира пищеварительного тракта диктует необходимость создать условия для преимущественного роста тех микробов, которые являются этиологической причиной возникшей патологии. Первостепенное значение в этом отношении принадлежит верно подобранным питательным средам.

Микрофлора тонкого кишечника представлена лактобактериями, бактероидами, клостридиями, кишечными палочками, энтерококками, стрептококками, стафилококками и другими бактериями. Особенно много микроорганизмов в толстом отделе кишечника. В количестве 10^8 КОЕ/г присутствуют превотеллы, фузобактерии, пептострептококки, эубактерии, бифидобактерии. Остальные резидентные микроорганизмы составляют меньшую часть микрофлоры толстого кишечника, их количество колеблется в пределах от 10^5 до 10^8 КОЕ/г. Это эшерихии, энтерококки, клостридии, лактобактерии и другие. В небольших количествах могут быть потенциально опасные бактерии *S. aureus*, *S. albus*, *C. difficile*, *P. aeruginosa* и другие.

В медицинской практике установлено, что особую опасность представляют микроорганизмы *Helicobacter pylori*, которые способны вызывать язву желудка, гастрит и онкопатологию.

Острые воспалительные процессы тонкого кишечника обуславливают такие бактерии, как энтеротоксигенные штаммы кишечной палочки, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, а также вирусы и некоторые простейшие. В первую очередь поражение тонкого и толстого отделов кишечника вызывают многочисленные бактерии, относящиеся к роду сальмонелл. Кроме этого, вызывать инфекционные процессы кишечника могут шигеллы, хламидии, микобактерии и другие патогены.

Для выделения и идентификации микроорганизмов при патологии желудочно-кишечного тракта предложены многие среды:

1) консерванты для транспорта биосубстратов - глицериновый, фосфатно-буферный, буферный глицерино-солевой;

- 2) среды обогащения – селенитовая, магниевая, среда Мюллера, среда Мюллера-Кауфмана, среда Рапопорт, среда для иерсиний;
- 3) среды для первичного посева материала – среда Плоскирева, среда Эндо, среда Левина, висмут-сульфитный агар;
- 4) среды для первичной идентификации – агар Клиглера, трехсахарный агар (по Олькеницкому), среда для определения подвижности;
- 5) среды для биохимической идентификации – агар Симмонса, агар Кристенсена, среда с малонатом, среда Кларка, среды Гиса с углеводами.

За рубежом предпочтение отдается некоторым другим питательным средам. Например, транспортной средой для материала из содержимого кишечника применяется среда Кери-Блейра. Эта среда способствует сохранению жизнеспособности сальмонелл, энтерококков, шигелл, но в случае хранения патматериала при комнатной температуре - ингибирует рост других микробов, обитающих в кишечнике. Однако при более высокой температуре наблюдается рост кишечной палочки.

В качестве эффективной дифференциально-диагностической среды за рубежом используют агар МакКонки. Эта среда применяется для выделения грамотрицательных микроорганизмов. Большое значение агар с сорбитом имеет для выделения *E. coli* 0157:H7, вызывающей тяжелую форму диареи. Состав среды следующий (на 1 литр):

Пептон	20,0 г
Сорбитол	15,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Соли желчных кислот	5,0 г
Нейтральный красный	0,03 г
Кристаллический фиолетовый	0,01 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,1±0,2	

На агаре МакКонки *E. coli* 0157 : H7 формируют бесцветные колонии, а другие эшерихии – розовые колонии. Для дифференциации сальмонелл и эшерихий широко применяют висмут-сульфитный агар, на котором сальмонеллы образуют колонии черного цвета, а эшерихии – бесцветные колонии.

Во многих зарубежных странах предложены питательные среды, обладающие большой селективностью. Состав одной из этих сред выглядит следующим образом (на литр):

Перевар желатина	10,0 г
Мясной экстракт	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Пептон	5,0 г
Манит	20,0 г
Натрия хлорид	1,0 г
Натрия пирувит	2,0 г
Натрия дезоксихолат	5,0 г
Нейтральный красный	0,03 г
Кристаллический фиолетовый	0,001 г
Антимикробная добавка	10,0 мл
Агар-агар	12,0 г
pH 7,4±0,2	

Эта среда предназначена для выделения и дифференциации *Y. enterocolitica*. Бактерии этого вида образуют на поверхности среды через 24 часа инкубации розовые колонии, а через 48 часов – крупные розовые колонии с красным центром.

Для изоляции из содержимого кишечника *B. cereus* и *S. aureus* применяют плотную среду, рецептура которой и технология ее приготовления не являются сложными. Среда состоит из нижеследующих ингредиентов (на литр):

Мясной экстракт	1,0 г
Пептон	10,0 г
Манит	10,0 г
Натрия хлорид	10,0 г
Полимиксан	100000 ЕД
Агар-агар	15,0 г
Эмульсия яичного желтка	50,0 мл
pH 7,1±0,2	

На этой среде *B. cereus* образуют колонии, вокруг которых зона преципитации может распространиться на большую часть среды в чашках Петри. Для определения подвижности упомянутых бактерий предложена среда, обеспечивающая наглядность подвижности микробов. Она имеет следующий состав (на литр):

Панкреатический перевар казеина	10,0 г
Дрожжевой экстракт	2,5 г
Глюкоза	5,0 г
Трис-буфер	3,0 г
Натрий двузамещенный фосфорнокислый	2,5 г
Агар-агар	3,0 г
pH 7,4±0,2	

Для медицинских специалистов довольно сложной является диагностика кишечной формы кампилобактериоза, вызываемой кампилобактериями. Например, энтероколит, вызываемый *Campylobacter jejuni*, широко распространенное заболевание, которое регистрируют по данным официальной статистики, в год только в США около 2,5 миллионов случаев. По клинической картине отличить кампилобактериоз от сальмонеллеза, дизентерии, иерсиниоза, колибактериоза не всегда возможно и поэтому лишь на основании бактериологического исследования можно поставить окончательный диагноз. В связи с этим важным является выбор питательных сред для транспортирования образцов патматериала и их исследования. Наиболее признанной транспортной средой является полужидкая среда Кери-Блейра. При диагностике упомянутой патологии используют среды обогащения с селективными добавками, когда контаминация субстрата незначительна. При высокой обсемененности биосубстрата посев на среду обогащения не обязателен. И все-таки считают, что

посев на среду обогащения увеличивает вероятность выделения патогена в три раза.

За рубежом широкое применение получила селективная плотная питательная среда Скирроу. В состав этого агара входят следующие компоненты (на литр в граммах):

Пептон	15,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Печеночный перевар	2,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар-агар	12,0 г
Селективная добавка	10,0 мл
pH 7,4±0,2	

Селективная добавка состоит из ванкомицина, полимиксина, три-метоприма.

Кроме указанной среды медицинские специалисты рекомендуют среду нижеприведенного состава (на литр):

Пептон	15,0 г
Мясной экстракт	5,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия глутамат	2,0 г
Натрия сукцинат	2,0 г
Магний хлористый	1,0 г
Кровь лошадиная	50,0 мл
pH 7,0±0,2	

Эта же среда используется с той же селективной добавкой, для выделения *Helicobacter pylori*, вызывающей язвенный гастрит, аденокарциному желудка и другие патологические процессы.

Животные и особенно, люди зачастую подвержены дисбактериозу. Ветеринарные и медицинские специалисты считают, что выбор питательных сред при диагностике дисбактериоза должен обеспечить

- количественную характеристику основных представителей резидентной микрофлоры кишечника (бактероидов, бифидобактерий, анаэробных кокков, эшерихий, энтерококков, лактобактерий, клостридий);

- количественную характеристику транзитной и минорной микрофлоры;

- выявление и количественную оценку атипичных для кишечника микробов (включая гемолизующие штаммы эшерихий);

Для выделения бактероидов, бифидобактерий, лактобактерий, эшерихий, клостридий, энтерококков, стафилококков, энтеробактерий, дрожжеподобных грибов набор питательных сред должен быть достаточно широким. Мерный высев биосубстрата на питательные среды в разведениях позволяет установить в нем наличие микробов и их количество.

Для бактериоидов предпочтительней является среда Шедлера, для бифидобактерий – среда Блаурока.

Для изоляции лактобактерий и установления их количества наиболее часто используют полужидкую или плотную среду МРС (аббревиатура от авторов: de Man, Rogosa, Sharpe).

Для выделения клостридий рекомендуется использовать хорошо известные среды Китт-Тароцци и Вильсон-Блера, которые обеспечивают достаточно типичный характер роста по раннему и бурному газообразованию на жидкой среде и по почернению и разрывам - на плотной.

М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич предлагают для выделения резидентной микрофлоры кишечника питательные среды, представленные в таблице 5.

Таблица 5 - Питательные среды для выделения представителей основной резидентной микрофлоры кишечного содержимого

Микроорганизмы	Основные питательные среды	Вспомогательные (дополнительные) питательные среды	Примечание
Бактериоиды	Бульон Шедлера Агар Шедлера Среда для бруцелл, анаэробный вариант	Анаэробный агар с кровью на основе эритрит-агара	-
Бифидобактерии	Среда Блаурокка	Агар Шедлера Другие среды для анаэробных бактерий	-
Лактобактерии	Среда МРС полужидкая Среда МРС плотная	-	По номенклатуре Ленцнера, МРС-2 - полужидкая, МРС-4 - плотная
Клостридии	Среда Китт-Тароцци Среда Вильсон-Блера	Агар Цейсслера	-
Эшерихии	Среда Эндо Питательный агар с кровью	Агар МакКонки Среда Левина	Кровяной агар необходим для определения числа гемолизирующих культур
Стафилококки	Элективно-солевой агар	Среда Чистовича	-
Энтерококки	Агар с азидом натрия	Желчно-эскулиновый агар СНА-агар с селективной добавкой	Необходима дифференциация со стрептококками группы D
Дрожжеподобные грибы	Агар Сабуро	-	-

ГЛАВА 6. Питательные среды для определения чувствительности микроорганизмов к антисептикам

Антибиотики широко применяют в ветеринарной и медицинской практике для лечения животных и человека при различных инфекционных болезнях. Важным условием их рационального применения является определение чувствительности возбудителей болезни к этим средствам. Существует два основных варианта определения чувствительности бактерий к антибиотикам:

- метод серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде;

- метод диск-диффузионный, заключающийся в диффузии антибиотика с дисков в агар.

Чаще всего применяют диск-диффузионный метод, который является более простым и доступным в техническом исполнении. Этот метод основан на диффузии антисептика из картонных (бумажных) дисков в засеянный выделенным микроорганизмом питательный агар. Плотная питательная среда обеспечивает не только рост засеянных бактерий, но и диффузию антимикробного средства.

Метод серийных разведений основан на способности микроорганизмов размножиться (или не размножиться) в среде, содержащей определенное количество антимикробного средства. При применении этого метода устанавливают минимальную концентрацию, которая ингибирует рост популяции. Значение питательной среды при осуществлении этого метода является очень важным. Если среда задерживает размножение бактерий или, наоборот, ускоряет их рост, а также если она не обеспечивает стабильность антисептика или ингибирует его действие, получить объективные данные не возможно. Метод серийных разведений может быть осуществлен и в жидкой, и в плотной питательной среде, но применяемая среда должна обладать определенным качеством.

Питательная среда не должна использоваться произвольно. Она должна быть определенного состава и обеспечивать оптимальный эффект при сравнении с контролем, предусматривающим применение тест-культур.

В РФ при работе с дисками получила широкое распространение среда следующего состава (из расчета на литр):

Питательный агар сухой	41,0 г
Крахмал растворимый	0,5 г
Динатрия гидрофосфат	3,5 г
pH 7,2-7,6	

Прежде чем задействовать эту среду в опыт ее проверяют по растворимости, прозрачности, аминному азоту, прочности студня, величине pH. Важнейшим показателем качества среды является ее способность обеспечивать определенный размер зон подавления роста тест-культур вокруг дисков с антибиотиками. В практике применяют только агаризованный вариант этой среды.

За рубежом используют среду, предложенную J. Muller и J. Hinton в

1941 г в США. В состав среды введены (дано на литр):

Инфуз (вытяжка из мяса говяжьего)	300,0 г
Гидролизат казеина кислотный	17,5г
Крахмал	1,5 г
Агар-агар	17,0 г
pH 7,4±0,2	

Среду Мюллера-Хинтон применяют для определения чувствительности к антибиотикам стафилококков, эшерихий, энтерококков, сальмонелл и других микроорганизмов.

Иностранной фирмой Oxoid Unipath выпускается агар для определения чувствительности широкого круга микроорганизмов. В состав этой питательной среды входят многие ингредиенты (на литр):

Пептон	10,0 г
Экстракт из мяса говяжьего	10,0 г
Глюкоза	2,0 г
Натрия хлорид	3,0 г
Динатрия фосфат	2,0 г
Натрия ацетат	1,0 г
Аденина сульфат	0,01 г
Гуанина гидрохлорид	0,01 г
Урацил	0,01
Ксантин	0,01 г
Тимин	0,00002 г
Агар-агар	12,0 г
pH 7,4±0,2	

К плотной питательной среде (агаризованной), используемой для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам методом диффузии с применением дисков, предъявляются нижеследующие требования.

Питательная среда как промышленного, так и лабораторного приготовления должна быть подвергнута внутрилабораторному контролю со всеми тест-культурами, а также с использованием не менее 8-10 вариантов дисков.

Каждая серия питательной среды должна иметь паспорт с указанием номера НТД и характеристикой ее качества.

В случае приготовления среды в лаборатории она после автоклавирования охлаждается равномерно по всей массе с использованием водяной бани при температуре 45-50°C.

Питательная среда разливается в чашки Петри, имеющие плоское дно и прямой угол между дном и стенкой. При внесении среды в чашки они должны находиться на строго горизонтальной поверхности. Толщина застывшего агара должна быть в пределах 4-5 мм. Чашки со средой можно хранить в холодильнике при 2-8°C не более недели.

Среда должна обладать определенным значением pH. Изменение показателя может в значительной мере повлиять на диаметр зон подавления роста микроорганизмов.

Среда должна быть стерильной, поэтому контроль ее на стерильность проводится в обязательном порядке. Использовать среду с признаками высыхания и избыточной влажностью на поверхности запрещается.

При постановке опыта необходимо иметь для сравнения проверенную референс-среду, которая позволяет выявить эффективность или дефектность применяемой новой питательной среды.

Большое значение имеет чувствительность питательной среды по отношению к скорости роста микроорганизмов. Зачастую сложно провести границу между слабым и интенсивным ростом бактерий, в связи с чем, применение референс-среды в параллельном опыте является вполне оправданным.

6.1. Среды для определения антибиотиков в лекарствах

Определение содержания антибиотиков в лекарствах имеет большое значение для терапии животных и человека в связи с тем, что при исследовании оценивается качество лекарства, а следовательно, эффективность его применения.

Основным методом определения содержания антибиотиков в лекарствах является микробиологический метод, т.к. он прост в техническом исполнении, не требует специального оборудования, позволяет определить наличие активной молекулы препарата, а не его фрагмента или метаболита.

Сущность метода заключается в диффузии антибиотика из лекарства в питательную среду, засеянную определенным тест-микроорганизмом. Диффузия антибиотика осуществляется из лунки или полого цилиндра, вокруг которых в процессе инкубации бактерий образуется зона подавления роста.

Необходимо отметить, что образование зоны подавления роста тест-бактерий - сложный процесс, который зависит от диффузной способности антибиотика, его стабильности в питательной среде, роста культуры, ее чувствительности к антибиотику и других факторов.

Решающее значение при определении наличия антибиотиков в лекарствах имеет питательная среда, ее показатели качества. Она обеспечивает сплошной рост тест-микроба и диффузию антибиотика в гель. Медицинские специалисты М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич (2008) считают, что «только при наличии своего рода баланса между тем и другим достигается информативность образующихся зон подавления роста микроба».

Универсальной среды выявления наличия антибиотиков в лекарствах не существует. Для определения содержания в лекарствах группы антибиотиков предложена определенная питательная среда или же несколько сред.

Питательные среды, предназначенные для определения антибиотиков, должны быть простыми по составу и обязательно иметь оптимальное значение показателя рН.

Ниже мы приводим рецептуру отдельных питательных сред для определения в лекарствах некоторых антибиотиков.

Среда для определения бензилпенициллина, ампициллина, оксациллина

Гидролизат мяса по Хоттингеру (130-140 мг % аминного азота)	1000,0 мл
Глюкоза	1,0 г
Динатрия гидрофосфат	3,0 г
Агар-агар	10,0-12,0 г
pH 6,8-7,0	

При использовании этой среды в качестве тест-микроба служат *Staphylococcus aureus*.

Взамен жидкого гидролизата мяса по Хоттингеру можно применять выпускаемый сухой препарат. Необходимо заметить, что глюкозу в среду вводят непосредственно перед ее использованием.

Для определения цефалексина и цефалотина применяют среду того же состава, но с другой тест-культурой, т.е. *Bacillus subtilis*.

Среда для эритромицина и олеандомицина

Гидролизат мяса по Хоттингеру (30-35 мг% аминного азота)	1000,0 мл
Динатрия гидрофосфат	3,0 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,8-8,0	

При применении этой среды в качестве тест-культуры используется культура *Bacillus subtilis*.

Среда для выявления антибиотиков тетрациклиновой группы

Гидролизат мяса по Хоттингеру (30-35 мг% аминного азота)	1000,0 мл
Глюкоза	10,0 г
Агар-агар	10,0-15,0 г
pH 6,8-7,0	

Представленная среда пригодна для определения в лекарствах тетрациклина, доксициклина, окситетрациклина, метациклина.

При постановке опыта используют тест-культуру *Bacillus subtilis*.

Среда для определения гентамицина и стрептомицина

Пропись среды для гентамицина:

Гидролизат мяса по Хоттингеру (30-35 мг% аминного азота)	1000,0 мл
Динатрия гидрофосфат	3,0 г
Агар-агар	15,0 г
pH 7,8-8,0	

При определении в лекарственном средстве гентамицина применяют тест-культуру бактерий *Bacillus pumilus*.

Среда для канамицина отличается большим содержанием в бульоне Хоттингера аминного азота (130-140 мг%) и меньшим количеством агар-агара – 10,0-12,0 г. Кроме этого, в качестве тест-культуры используют *Bacillus cereus var. mycoides*.

ГЛАВА 7. Питательные среды для санитарно-бактериологической оценки пищевых продуктов

Микрофлора пищевых продуктов является очень сложным объектом санитарной микробиологии, что можно объяснить следующим положением:

- большим разнообразием этой микрофлоры и ее обилием;
- использованием при приготовлении многих пищевых продуктов специфических видов микроорганизмов;
- применением пока еще не всегда эффективных методов индикации и выделения микроорганизмов.

Пищевые продукты могут быть фактором передачи многих возбудителей бактериальных болезней: эшерихиоза, сальмонеллеза, ботулизма, туберкулеза и других.

Санитарно-бактериологическое исследование проводится с целью определения качества сырья, из которого готовят пищевые продукты, оценки санитарно-гигиенического режима процесса приготовления, хранения и реализации их, а также по эпидемическим показателям в случае вспышки инфекционной болезни, по специальным показаниям при порче сырья или готовых продуктов.

Для проведения санитарно-бактериологического исследования пищевых продуктов нужны качественные питательные среды. При оценке качества пищевых продуктов специалисты должны руководствоваться требованиями действующих нормативно-методических документов: Санитарными правилами и нормами (СанПин), государственными отраслевыми стандартами (ГОСТ), Методическими указаниями (МУ), Методическим указанием по методам контроля (МУК).

Известно, что способы выявления и подсчета количества живых клеток микроорганизмов, определения их тинкториально-морфологических, культуральных, биохимических, таксономических особенностей основываются на культивировании микрофлоры, содержащейся в исследуемых субстратах, на питательных средах и условиях, благоприятных для роста и размножения определенных групп или видов микроорганизмов. Для выделения бактерий применяют одно- или многостадийное культивирование с применением обогатительных неселективных, селективно-диагностических и диагностических питательных сред.

При посеве на плотные среды разведения исследуемых пищевых продуктов делают с таким расчетом, чтобы общее количество сформировавшихся колоний, выросших в одной чашке Петри, колебалось в пределах 3-300, а количество специфических бактерий – 15-150, плесеней – 5-50.

Жидкие продукты фильтруют через мембранные фильтры, размер пор которых не превышает размер определяемых микроорганизмов. Затем, после промывания фильтров дистиллированной водой, их помещают на плотные или в жидкие питательные среды.

При посеве в жидкие среды делают такое количество десятикратных разведений, чтобы в пробирках с наибольшим разведением рост бактерий отсутствовал.

После культивирования подсчитывают количество колоний на поверхности плотной среды и рассчитывают количество микроорганизмов в 1 мл исследуемого продукта. По окончании термостатирования жидких сред определяют наиболее вероятное число (НВЧ) бактерий в исследуемом продукте, используя при этом применяемые в микробиологической практике методики.

Идентификацию выросших бактерий проводят на основе изучения их тинкториально-морфологических, культуральных, биохимических, антигенных и других свойств.

Пищевые продукты не бывают стерильными в связи с тем, что многие из них готовятся с применением микрофлоры (например, молочно-кислые), к тому же значительное количество бактерий попадает с исходным сырьем и в процессе приготовления, транспортировки, хранения продуктов. Обсемененность продуктов микробами в значительной степени зависит от консистенции продуктов (жидкие, полужидкие, пастообразные, плотные, сыпучие и т.д.), питательности, рН и других факторов.

Многие виды микроорганизмов, попадающие в пищевые продукты, могут вызывать инфекционные болезни, которые по клиническим признакам и происхождению подразделяют на две основные группы – пищевые инфекции и пищевые отравления.

Микробную контаминацию пищевых продуктов вызывают микроорганизмы различных систематических групп, однако к числу санитарно-показательных относят лишь несколько видов. Санитарно-показательными бактериями являются: кишечная палочка, сальмонеллы, шигеллы, клостридии, стафилококки, листерии, протей. Самыми распространенными показательными бактериями являются представители семейства *Enterobact eriaceae*.

При микробиологическом контроле пищевых продуктов и воды обязательным является учет общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАМ) – бактерий, дрожжей и плесневых грибов.

Необходимо подчеркнуть, что контроль микробиологической чистоты продуктов питания регламентируется ГОСТами.

7.1. Среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Количественные показатели микрофлоры для оценки качества продуктов имеют существенное значение. Полагают, что если пищевой продукт приготовлен без участия микроорганизмов, обуславливающих ферментативные процессы, то обнаружение в нем мезофильных аэробов в количестве 10^6 г/см³ и более делают его опасным для потребления и здо-

ровья человека.

Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов рекомендуют следующие среды:

- глюкозо-казеиновый агар и бульон;
- мясо-пептонный агар и бульон;
- мясо-пептонный агар (бульон) с глюкозой и дрожжевым экстрактом;
- плотная среда Хоттингера с глюкозой и дрожжевым экстрактом;
- среда из сухого питательного агара;
- среда из сухого питательного агара с глюкозой.

Рецепты некоторых из этих сред приведены ниже.

Глюкозо-пептонный агар (на литр):

Пептон	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Мясная вода	1000,0 мл
Агар-агар	12,0 г
pH – 7,0-7,2	

Бульон готовится по такой же прописи, но без добавления агара. Среду стерилизуют при 121°C в течение 20 минут.

Глюкозо-казеиновый агар (на литр):

Триптон	5,0 г
Дрожжевой экстракт	2,5 г
Глюкоза	1,0 г
Агар-агар	13-15,0 г
pH 7,0±0,1	

В этой среде триптон представляет собой ферментативный гидролизат казеина. Среду стерилизуют в течение 15 минут.

Плотная среда Хоттингера с глюкозой и дрожжевым экстрактом (на литр):

Дрожжевой экстракт	0,5 г
Глюкоза	5,0 г
Агар-агар	15,0-20,0 г
Бульон Хоттингера	1000,0 мл
pH 7,0±0,1	

Среды из сухого питательного агара, сухого питательного агара с глюкозой промышленного производства готовят по способу, указанному на этикетке. Все среды стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 минут.

7.2. Питательные среды для выделения и определения энтеробактерий

Контаминация пищевых продуктов энтеробактериями представляет опасность для здоровья человека и является свидетельством низкого санитарного уровня их производства и условий хранения.

Изоляцию и определение количества микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* в продуктах проводят с использованием следующих сред:

1. Среда Кесслера.
2. Буферный глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью.
3. Бульон МакКонки.
4. Среда Кода.
5. Среда Эндо.
6. Среда Гисса.

Состав среды Кесслера (г/на литр):

Пептон	10,0
Глюкоза	2,5
Желчь говяжья сухая	5,0
Кристаллический фиолетовый	0,05
pH 7,3±0,2	

Буферный глюкозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью (на литр):

Пептон	10,0 г
Динатрия гидрофосфат	6,45 г
Калия гидрофосфат	2,0 г
Глюкоза	5,0 г
Желчь говяжья сухая	20,0
Бриллиантовый зеленый	0,015
pH 7,2±0,1	

Эту среду не стерилизуют, ее расфасовывают по 10 мл в стерильные пробирки с поплавками. Энтеробактерии вызывают газообразование и помутнение среды.

Среда МакКонки

Эту среду особенно широко используют за рубежом. Ее состав (на литр):

Пептон	20,0 г
Глюкоза	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Желчь говяжья сухая	5,0 г
Бромкрезоловый пурпурный	0,01
pH 7,2±0,1	

Среду расфасовывают в пробирки с поплавками и стерилизуют при 121°C в течение 15 минут. Наличие энтеробактерий в продукте определяют по помутнению, изменению цвета среды и газообразованию.

Среда Кода (на литр):

Пептон	13,0 г
Сульфенол (алкибензолсульфанат)	10,0
Натрия хлорид	3,63 г
Лактоза	10,0 г
Натрия карбонат безводный	0,32 г
Бромтимоловый синий	0,05 г
pH 7,8±0,2	

Среда Кода коммерческая и ее готовят по прописи на этикетке. Она прозрачная, зеленого цвета. Эту среду разливают по 10 мл в пробирки с поплавками. Присутствие бактерий в продукте определяют по изменению цвета среды от зеленого до желтого, ее помутнению и газообразованию.

Для подтверждения принадлежности выросших в средах микроорганизмов к бактериям семейства *Enterobacteriaceae* производят высевы на среду Эндо следующего состава (на литр):

Панкреатический гидролизат кильки	11,5 г
Экстракт кормовых дрожжей	0,86 г
Лактоза	12,9 г
Динатрия гидрофосфат	0,48 г
Натрия сульфит	0,83 г
Натрия хлорид	3,6 г
Натрия карбонат	0,01
Фуксин основной	0,22
Агар-агар	9,6
pH 7,8±0,2	

Диагностические свойства среды обусловлены способностью бактерий ферментировать лактозу с образованием ацетальдегида, который, реагируя с сульфитом натрия, вызывает окраску среды и колоний в темно-красный цвет.

Среда Гисса с глюкозой (г/на литр):

Панкреатический гидролизат кильки	4,9 г
Глюкоза	5,0 г
Динатрия гидрофосфат	0,36 г
Натрия хлорид	5,0 г
Бромкрезоловый пурпурный	0,02г
Агар-агар	4,4г
pH 7,4±0,2	

Среду расфасовывают по 3-4 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при 112°C в течение 20 минут. Готовая среда имеет фиолетовый цвет.

Дифференцирующее свойство среды обеспечивается наличием в ее составе индикатора. В кислой среде он имеет желтый цвет, в щелочной - фиолетовый. Энтеробактерии расщепляют глюкозу с образованием кис-

лых продуктов, в результате чего окраска среды становится желтой. Образование газов определяют по разрывам среды в толще геля.

7.3. Питательные среды для выделения дрожжей и микромицетов

Дрожжи и микромицеты способны вызывать порчу продуктов, а их микотоксины опасны для здоровья и жизни человека. Метод выявления дрожжей и грибов основан на высеве продукта, его гомогената или их разведений на селективные среды. Селективность этих сред обеспечивается высоким содержанием углеводов, противобактериальных антибиотиков и низким уровнем pH.

Принадлежность микроорганизмов к дрожжам и плесневым грибам определяют по характерному росту на питательных средах и морфологии клеток.

В санитарной микробиологии используют главным образом среду Сабуро и сусло-агар.

Неохмеленное пивное сусло разводят водопроводной водой до содержания сахара 7-8° по Баллингу (измеряют сахарометром) и стерилизуют в бутылках при 110°С 10 минут. После стерилизации сусло может сохраняться длительное время. Перед употреблением надосадочную жидкость осторожно сливают с осадка. К 1 литру стерильного сусла добавляют 18 г агар-агара, нагревают до его растворения, расфасовывают среду в стерильные пробирки и стерилизуют при 110°С 10 минут.

Для подавления роста бактерий в среду Сабуро и сусло-агар добавляют один из противобактериальных антибиотиков в количестве из расчета на литр:

Левомицина сукцинат – 100 мг

Окситетрациклин – 100 мг

Окситетрациклин с гентамицином 100 мг и 50 мг соответственно.

Пенициллин и стрептомицин-50000 - 100000 ЕД и 40 мг соответственно

Посевы на указанных средах выращивают при температуре 24°С в течение 5 суток, после чего проводят подсчет количества выросших колоний. Для количественного подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 колоний дрожжей и от 5 до 50 колоний плесневых грибов.

7.4. Питательные среды для изоляции и идентификации энтерококков и стафилококков

Энтерококки являются шаровидными грамположительными бактериями. В поле зрения микроскопа располагаются попарно, короткими цепочками, скоплениями неопределенной формы.

Характерными для их свойствами являются: способность расти на

средах, содержащих до 40% желчи, до 17% NaCl, устойчивость к высокой щелочности среды (рН до 9,6).

Энтерококки – обитатели кишечника и отнесены к числу санитарно-показательных микроорганизмов. Во внешней среде они погибают раньше, чем *E. coli*, что позволяет использовать этих бактерий в качестве показателя свежего фекального загрязнения.

Метод изоляции и количественного определения энтерококков (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*) в пищевых продуктах основан на высеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую селективную среду или на поверхность плотной среды с последующим выдерживанием посевов при температуре 37°C в течение 24-48 часов, а затем определении принадлежности выросших микроорганизмов к энтерококкам и пересчете их количества на 1 г (мл) продукта.

Для определения количества энтерококков 0,1 или 0,2 мл продукта или его разведения высевают на поверхность селективного агара по Сланцу и Бертли или на канамицин азидно-эскулиновый агар или же на молочно-ингибиторную среду.

Состав этих сред мы приводим ниже.

Селективный агар по Сланцу и Бертли (на литр):

Пептон	20,0 г
Дрожжевой экстракт	25,0 г
Глюкоза	2,0 г
Натрия азид	0,4 г
Дикалия гидрофосфат	4,0 г
Агар-агар	15±30 г

Основу среды стерилизуют текучим паром 30 минут, охлаждают до 50°C и добавляют 4,0 см³ раствора азидата натрия с концентрацией 100 г/л, тщательно перемешивают и расфасовывают в чашки Петри.

Канамицин азидо-эскулиновый агар (на литр):

Пептон из казеина	20,0 г
Дрожжевой экстракт	25,0 г
Глюкоза	2,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия цитрат	1,0 г
Железа(III)-аммония гидроцитрат	0,5 г
Натрия азид	0,15 г
Канамицина сульфат	0,02 г
Эскулин	1,0 г
Агар-агар	15,0
рН 7,1±0,1	

Основу среды стерилизуют при 121°C в течение 15 минут, охлаждают до 50°C, добавляют 1,5 мл раствора азидата натрия с концентрацией 100 г/л и 0,4 мл раствора канамицина сульфата с концентрацией 50 г/л.

Молочно-ингибиторная среда: (на литр):

Мясо-пептонный агар	850,0 мл
Молоко обезжиренное	150,0 мл
Раствор кристаллического фиолетового с концентрацией 0,1 г/на литр	12,5 мл
Раствор калия теллурита с концентрацией 20 г/л	10 мл
Полимиксин М сульфат	200000 ЕД

Калия теллурит и полимиксин подавляют рост сопутствующих микроорганизмов. Эту среду не стерилизуют, но разливают в стерильные чашки Петри.

Кроме указанных сред для выявления энтерококков в продуктах используют:

- глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с рН 7,2 и 9,6;
- щелочную полимиксиновую среду.

Глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с рН 7,2 и 9,6 (на литр):

Ферментативный гидролизат казеина	5,0
Дрожжевой экстракт	12,5
Глюкоза	1,0
рН 7,2±0,1 или 9,6±0,1	

Эту среду стерилизуют при 121°С в течение 15 минут.

Щелочная полимиксиновая среда. Основа этой среды (на литр):

Мясо-пептонный бульон	400,0 мл
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	10,0 г
Дрожжевой экстракт	10,0 мл

Основу среды стерилизуют при 110°С в течение 12 минут, охлаждают и добавляют 250 мл раствора натрия карбоната с массовой концентрацией 21,2 г/л и 250 мл раствора бикарбоната натрия с массовой концентрацией 10 г/литр. После этого устанавливают рН 10,1±0,1, добавляют 200000 ЕД полимиксина М сульфата, 5,0 мл спиртового раствора бромтимолового синего с концентрацией 16 г/литр. Среду хранят в защищенном от света месте при 4°С не более 7 суток.

При исследовании пищевых продуктов делают их посевы в жидкие среды и инкубируют при 37°С в течение 24-48 часов.

Из жидких сред для получения изолированных колоний делают пересевы на плотные среды, которые инкубируют при 37°С в течение 24-48 часов.

На среде Сланец-Бертли колонии энтерококков красно-розовые или

карминовые с коричневым оттенком. На среде с канамицином колонии этих бактерий – оливково-зеленые до темно-коричневых-черных, а на молочно-ингибиторной – черные.

Для подтверждения принадлежности бактерий, сформировавших характерные колонии на плотных средах к энтерококкам, делают препараты для микроскопии, окрашивают по Граму, микроскопируют, ставят тест на каталазу.

Стафилококки относятся к бактериям, широко распространенным в природе. Это мелкие грамположительные микроорганизмы. В препаратах-мазках располагаются одиночно, попарно, гроздевидными скоплениями. Стафилококки не требовательны к питательным средам. На плотных средах образуют колонии белого, кремового, лимонно-желтого или золотистого цвета.

При исследовании продуктов учитывают только коагулазоположительные штаммы стафилококков, к которым относят *Staphylococcus aureus*. Эти бактерии могут вызывать различные гнойно-септические инфекции и пищевые отравления.

Многие отравления связывают с употреблением молока и молочных продуктов, содержащих 10^6 - 10^9 кл/г.

Для определения количества *S. aureus* в 1 г (мл) продукта из его навески готовят исходное и ряд последовательных разведений, из которых делают посев (по 0,1 или 0,2 мл) на одну из селективно-диагностических сред:

- среда Байрд-Паркер агар;
- молочно-солевой агар;
- яично-желточно-солевой агар.

В практике чаще всего используют среду Байрд-Паркер агар.

Среда Байрд-Паркер агар.

Состав основы среды (на литр):

Тритон	10,0
Дрожжевой экстракт	1,0 г
Мясной экстракт	5,0 г
Литий хлористый гексагидрат	5,0 г
Агар-агар	12,0 г

Раствор пирувата натрия

Натрия пируват	20,0 г
Вода дистиллированная	100,0 мл

Раствор глицина

Глицин	20,0 г
Вода дистиллированная	100,0 мл

Для приготовления этой среды, кроме раствора пирувата натрия и раствора глицина, нужна желточная эмульсия. Ее готовят следующим образом. Свежее куриное яйцо моют водой, протирают спиртовым тампоном, отделяют желток и вносят его в 100 мл стерильного физиологиче-

ского раствора. Приготовленная эмульсия хранится при 0-5°C не более 72 часов.

Все компоненты основы среды растворяют в 1 л дистиллированной воды, устанавливают рН 7,2±0,1, расфасовывают в колбы по 90 мл и стерилизуют 20 минут при температуре 121°C. Затем к 90 мл расплавленной основы среды добавляют стерильные растворы: 6,3 мл раствора глицина, 5 мл раствора пирувата натрия, 1 мл раствора теллурита калия с концентрацией 10 г/л и 5 мл желточной эмульсии.

В этой среде лития хлорид угнетает рост сопутствующей микрофлоры, глицин и пировиноградная кислота усиливают рост *S. aureus*.

При выращивании стафилококков фосфолиназы отщепляют жирные кислоты от фосфолипидов желтка, вызывая образование вокруг колоний ополесцирующей зоны.

Молочно-солевой агар (на литр):

Питательный агар (коммерческий)	35,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
Молоко обезжиренное	1000,0 мл
Агар-агар	20,0 г

Все компоненты среды растворяют в 1 л дистиллированной воды, фильтруют через ватный тампон, стерилизуют при 121°C в течение 20 минут. После стерилизации охлаждают до 45°C и добавляют обезжиренное молоко, расфасовывают в чашки Петри.

Яично-желточно-солевой агар (на литр):

Питательный агар (коммерческий)	35,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
Эмульсия желточная	50,0 мл

В 1 л дистиллированной воды растворяют сухой питательный агар, натрия хлорид, расфасовывают во флаконы и стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 минут. После стерилизации охлаждают до 45°C и добавляют желточную эмульсию. Готовую среду в чашках Петри можно хранить в холодильнике в течение 5 суток.

На указанных выше средах стафилококки формируют характерные колонии. На Байрд-Паркер агаре колонии *S. aureus* черные, блестящие, окруженные зоной лецитиназной активности. На молочно-солевом агаре колонии окрашены в желтый, золотистый, лимонно-желтый, кремовый цвет или же белые.

На яично-желточно-солевом агаре колонии стафилококков окружены зоной лецитиназной активности. Для подтверждения принадлежности бактерий в колониях к *S. aureus*, из колоний делают посеы на поверхность МПА, инкубируют при температуре 37°C в течение 24 часов, а затем выросшие микробы окрашивают по Граму, микроскопируют, определяют способность их коагулировать плазму крови кролика, образовывать каталазу и ферментировать мальтозу в анаэробных условиях.

7.5. Среды для выделения и индентификации сальмонелл

К роду *Salmonella* относятся возбудители брюшного тифа, паратифов, сальмонеллезов, токсикоинфекций. Род насчитывает более 3500 сероваров. Сальмонеллы представляют собой грамотрицательные палочки, подвижные, не образующие спор бактерии. В пищевых продуктах, особенно в мясе, проявляют термическую устойчивость. В организм человека бактерии попадают в основном с водой и пищей.

Определение вида и сероварианта сальмонелл осуществляют с применением многих селективных, дифференциально-диагностических сред и серологических тестов. Выделение бактерий рода *Salmonella* включает высеив определенного количества продукта в жидкую неселективную, а затем - в селективные среды с последующей идентификацией бактерий на плотных дифференциально-диагностических средах. Предварительное выращивание сальмонелл проводят обычно на забуференной пептонной воде.

Забуференная пептонная вода. Ее состав (г/на литр):

Пептон	10,0
Натрия хлорид	5,0
Динатрия гидрофосфат водный	9,0
Калий дигидрофосфат	1,5

Среду стерилизуют при 121°C в течение 20 минут.

Исследуемую пробу продукта засевают в среду в соотношении 1:9 и инкубируют 18-20 часов при 36°C. Затем, для селективного обогащения, культуру, выросшую на забуференной пептонной воде, засевают по 10 мл в 100 мл селективных сред – магниевой, тетратионатной, селенитовой.

Магниевая среда.

Эта среда представляет собой смесь трех растворов. Состав растворов:

Раствор 1 – 8,4 г пептона, 14,3 г натрия хлористого, 40 мл дрожжевого экстракта, 2,85 г калия дигидрофосфата растворяют при нагревании в 1780 мл дистиллированной воды.

Раствор 2 – 71,4 г магния хлорида ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) растворяют в 180 мл дистиллированной воды.

Раствор 3 – 1,8 мл раствора бриллиантового зеленого концентрации 5 г/л.

Растворы объединяют, расфасовывают во флаконы и стерилизуют при 121°C в течение 30 минут.

Тетратионатная среда (Мюллер-Кауфман).

Основу среды готовят путем внесения в 100 мл мясо-пептонного бульона 4,5г стерильного кальция углекислого и последующей стерилизации при 112°C в течение 20 минут.

К 100 мл основы среды асептически добавляют в следующем порядке 10 мл раствора гипосульфита натрия ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$), 2 мл йодного

раствора, 0,2 мл раствора бриллиантового зеленого и 5 мл желчи.

Приготовление растворов:

- 50 г гопосульфата натрия растворяют в мерной колбе объемом 100 мл и доводят объем до метки, стерилизуют при 121°C 20 минут;

- 25 г йодистого калия растворяют в небольшом количестве воды в колбе вместимостью 100 мл, доводят до метки и хранят в плотно закрытом темном сосуде;

- 5 г бриллиантового зеленого растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят до метки и хранят в емкости из темного стекла;

- 10 г сухой желчи растворяют в 100 мл дистиллированной воды и стерилизуют 20 минут при 121°C.

Селенитовая среда (г/на литр):

Пептон	5,0
Дикалия гидрофосфат	7,0
Натрия дигидрофосфат	3,0
Лактоза	4,0
Натрия гидроселенит	4,0
pH 7,0±1	

Эту среду доводят до кипения и расфасовывают в стерильные пробирки, хранят при 5°C не более 7 суток.

Для выделения и идентификации сальмонелл культуры их с селективных обогатительных сред засевают на поверхность плотных дифференциально-диагностических сред: висмут-сульфитный агар, среду Плоскирева и Эндо.

Висмут-сульфит агар (г/на литр):

Триптический гидролизат кильки	12,7
Глюкоза	3,9
Висмута цитрат	2,38
Соль Мора	0,97
Натрия сульфат	4,79
Динатрия гидрофосфат	3,68
Бриллиантовый зеленый	0,028
Натрия карбонат	0,65
Агар-агар	10,0
Агароид	20,9
pH 7,5±0,1	

Среду стерилизуют кипячением. Готовая среда имеет светло-зеленый цвет. Дифференцирующие свойства среды обусловлены способностью сальмонелл продуцировать сероводород, образующий в реакции с цитратом висмута соединение черного цвета - сернистый висмут.

Бриллиантовый зеленый и сульфит натрия в составе среды являются ингибиторами роста микроорганизмов-ассоциантов.

Сухую коммерческую среду готовят в соответствии с указанием на этикетке и используют в день приготовления.

Среда Плоскирева (г/на литр):

Панкреатический гидролизат кильки	16,0
Натриевые соли желчных солей	8,1
Лактоза	7,6
Динатрия гидрофосфат	2,25
Натрия цитрат	8,82
Натрия тиосульфат	6,86
Йод металлический	0,12
Натрия карбонат	1,42
Нейтральный красный	0,04
Бриллиантовый зеленый	0,02
Агар-агар	8,75
pH 7,2±0,1	

В среде Плоскирева рост сопутствующих микроорганизмов подавляется солями желчных кислот и бриллиантовым зеленым. Готовая среда коричнево-красного цвета. Ее выпускают НПО «Питательные среды» и приготавливают согласно указаниям на этикетке.

Среда Эндо (г/на литр):

Панкреатический гидролизат кильки	11,5
Экстракт кормовых дрожжей	0,86
Лактоза	12,9
Динатрия гидрофосфат	0,48
Натрия сульфит	0,83
Натрия хлорид	3,6
Натрия карбонат	0,01
Фуксин основной	0,22
Агар-агар	9,6
pH 7,8±0,2	

Коммерческую среду Эндо готовят по указанию на этикетке. В этой среде бактерии способны ферментировать лактозу с образованием ацетальдегида, который, соединяясь с сульфитом натрия, вызывает окраску колоний в темно-красный цвет.

На вышеуказанных средах бактерии рода *Salmonella* формируют характерные колонии:

- на висмут-сульфитном агаре колонии черного цвета с металлическим блеском, зеленоватые с темно-зеленым ободком и пигментированием среды;

- на средах Плоскирева и Эндо образуются бесцветные или слегка розоватые прозрачные колонии.

Для подтверждения принадлежности выделенных бактерий к роду *Salmonella* из колоний каждой дифференциально-диагностической среды делают высевы на трехсахарный агар.

Трехсахарный агар (г/на литр):

Мясная вода	1000,0
Пептон	10,0
Дрожжевой экстракт сухой	3,0
Лактоза	10,0
Сахароза	10,0
Глюкоза	1,0
Железа нитрат или железа (II) сульфат (Fe-SO ₄ ·6H ₂ O)	0,2
Натрия тиосульфат	0,3
Феноловый красный	0,024
Агар-агар	15,0
pH 7,2±0,2	

Среду стерилизуют при 121°C в течение 10 минут. Среда имеет коричнево-красный цвет. Ее расфасовывают в пробирки, скашивают таким образом, чтобы столбик от дна пробирки до скошенной поверхности был высотой 2-2,5 см.

Посевы на этой среде выдерживают в термостате при 121°C в течение суток. Почернение среды является свидетельством образования бактериями сероводорода, а пожелтение столбика среды с разрывом агара указывает на ферментацию глюкозы. Культуры, вызывающие эти изменения среды, подвергают изучению их неспособность образовывать индол, ферментировать маннит и сахарозу. Возможность культур бактерий расщеплять мочевины определяют с применением агара Кристенсена с мочевиной. Состав основы среды (г/на литр):

Пептон	1,0
Глюкоза	1,0
Натрия хлорид	2,0
Калия дигидрофосфат	2,0
Мочевина	20,0
Феноловый красный	0,01
Агар-агар	15,0
pH 6,7±0,1	

Основу среды стерилизуют при 121°C в течение 30 минут. Необходимо отметить, что мочевины в виде 40%-ного раствора стерилизуют отдельно путем фильтрации или текучим паром в течение 30 минут. Для приготовления среды к 950 мл основы ее асептически добавляют 50 мл раствора мочевины. Среду расфасовывают в стерильные пробирки по 6-7 см³ и скашивают таким образом, чтобы столбик среды от дна пробирки до скошенной поверхности был не менее 2-2,5 см высотой. Посевы производят штрихом и уколом в столбик агара, расщепление мочевины сопровождается повышением pH и изменением цвета среды с красного на синий.

7.6. Среда для выявления и идентификации бактерий рода *Clostridium*

Род *Clostridium* включает большое количество патогенных и непатогенных бактерий. Многие представители рода являются обитателями кишечника человека и сельскохозяйственных животных. Они обладают терioreзистентностью и способностью продуцировать токсические вещества. Контаминация продуктов питания *C. perfringens* может вызывать пищевые отравления у людей. Мясные блюда чаще всего оказываются причиной токсикоинфекций, связанных с наличием в них упомянутых бактерий.

Для выявления *C. perfringens* используют следующие среды:

- триптозо-сульфат-цикloserиновый агар;
- сульфит-полимиксин-неомициновый агар;
- сахарно-кровяной агар по Цейсселеру с антибиотиками;
- агар Вильсона-Блера.

Триптозо-сульфат-цикloserиновый агар (г/на литр):

Триптоза	15,0
Пептон	5,0
Дрожжевой экстракт	25,0
Натрия тиосульфат безводный	1,0
Цитрат аммонийного железа	1,0
Агар-агар	20,0
рН 7,6±0,1	

Среду стерилизуют при 121°C в течение 20 минут. Перед применением к 100 см³ среды добавляют 1 см³ раствора цикloserина концентрации 40 г/л.

Сульфит-полимиксин-неомициновый агар (г/на литр):

Пептон	17,0
Дрожжевой экстракт	15,0
Натрия хлорид	5,0
Натрия неосульфат безводный	1,0
Железа аммонийного цитрат	1,0
Агар-агар	12-15,0

Среду стерилизуют при 121°C в течение 20 минут. Перед применением в расплавленную и охлажденную до 45-50°C среду добавляют 1 см³ раствора неомицина сульфата с концентрацией 50 г/л и 8 мл раствора полимиксина с концентрацией 2,5 г/л.

Сахарно-кровяной агар по Цейсселеру с антибиотиками (г/на литр):

К 1000 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА добавляют 2 г глюкозы и 15-20 мл свежезвзятой стерильной дефибринированной крови крупного рогатого скота, рН среды 7,2-7,4. Непосредственно перед применением добавляют 1 мл раствора цикloserина с концентрацией 40 г/л или 0,5 мл раствора неомицина сульфата с концентрацией 10 г/л. Хранят при 4°C не более 3 суток.

Агар Вильсона-Блера (на литр):

Железоаммонитные квасцы (раствор концентрированный 50 г/л)	1,0 мл
Натрия сульфат (раствор концентрированный 200 г/л)	10,0 мл
Мясо-пептонный агар с 1% глюкозы рН 7,5-7,8	100,0 мл

Растворы железоаммонийных квасцов и натрия сульфат готовят на стерильной дистиллированной воде. Раствор натрия сульфата стерилизуют текучим паром в течение 1 часа.

К 1000 мл расплавленной и охлажденной основы среды добавляют 10 мл раствора сульфата и 1 мл железоаммонийных квасцов.

Посевы на вышеуказанных средах выращивают при 37°C в течение 18-24 ч. в анаэробных условиях.

На агаре Цейслера с антибиотиками образуются колонии, зеленющие на воздухе и окруженные зоной гемолиза. На других средах формируются колонии, имеющие форму двояковыпуклой линзы, комочка ваты или «самолетика».

Для подтверждения принадлежности колоний к *C. perfringens* их пересевают в среду ниже следующего состава.

Основа среды (г/на литр):

Мясная вода	800 мл
Мясной экстракт	10,0
Пептон	10,0
Дрожжевой экстракт (сухой)	1,5
Натрия ацетат	5,0
Крахмал растворимый	1,0
Глюкоза	1,0
Цистеина гидрохлорид	0,5
Агар-агар	2,0

Основу среды стерилизуют при 121°C в течение 15 минут.

Перед засевом среды в нее добавляют в виде растворов сульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и цитрат железа ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), простерилизованные фильтрованием. Растворы сульфата натрия и цитрата железа с концентрацией 40 г/мл и 70 г/мл соответственно, смешивают в равных объемах и 20 мл смеси добавляют к основе среды. Посевы инкубируют при 37°C в течение 18-24 часов. Полученные культуры изучают на предмет морфологических и биохимических свойств.

Способность бактерий ферментировать лактозу, сбрасывать лакмусовое молоко определяют путем высева их в пробирки с лакмусовым молоком, которое готовят следующим образом: 100 мл свежего молока подщелачивают 10%-ным раствором пищевой соды до слабощелочной реакции, кипятят, добавляют 100 мл дистиллированной воды и 5 мл лак-

мусовой настойки, 2 мл хлороформа (для обезжиривания молока), перемешивают и сливают в сосуд, который плотно закрывают резиновой пробкой и хранят в темном месте 2-3 дня. Приготовленную среду расфасовывают в пробирки по 5 мл и стерилизуют при 115°C 20 минут.

Посевы на этой среде инкубируют в течение 8-12 часов при температуре 37°C и 3-5 часов - при температуре 45°C.

Для изучения подвижности и редукции нитратов используют полужидкую питательную среду следующего состава (г/на литр):

Мясо-пептонный бульон	1000,0
Глюкоза	5,0
Глицерин	5,0
Калия нитрат (не содержащий нитрит)	1,0
Динатрия фосфат (безводный)	2,5
Агар-агар	3,0
pH 7,4±0,2	

Среду фасуют в пробирки высоким столбиком и стерилизуют при 121°C в течение 20 минут. Перед использованием среду кипятят в водяной бане 10 минут. В этой среде *S. perfringens* растут лишь по линии посева, т.е. они не подвижны. В случае редукции нитратов среда окрашивается в красный цвет, но при предварительном добавлении в среду реактива Гисса.

Способность клостридий разжижать желатин и ферментировать лактозу определяют с применением желатин-лактозной среды следующего состава:

Пептон или триптоза	15,0
Дрожжевой экстракт	50,0
Желатин	120 г
Динатрия фосфат	5,0
Лактоза	10,0
Феноловый красный (1%-ного раствора)	5,0 мл
pH 7,4±0,1	

Среду расфасовывают по 10 см³ в пробирки и стерилизуют при температуре 121°C в течение 15 минут. Перед использованием среду кипятят на водяной бане и охлаждают до застывания в холодильнике. Посев бактерий делают уколом и инкубируют при 37°C в течение суток, а потом помещают в холодильник. После охлаждения среды отмечают ее изменения, вызванные ростом и размножением бактерий.

7.7. Среды для выявления и идентификации листерий

Бактерии рода *Listeria* широко распространены в природе, способны длительно сохраняться во внешней среде. Некоторые виды листерий патогенны для человека и животных. В частности, возбудителем листериоза, опасной болезни для теплокровных, являются бактерии *Listeria*

monocytogenes. Это палочковидные микроорганизмы, но иногда принимают форму кокков, вибрионов, овоидов, нитей. В препаратах бактерии располагаются одиночно, попарно, в виде римской цифры V, полисадом по 5 клеток, неопределенными скоплениями. Листерии окрашиваются грамположительно, в старых культурах - грамотрицательно. В молодых культурах в случае выращивания при 22°C бактерии подвижны, спор и капсул не образуют.

Листерии, как и многие другие бактерии, могут контаминировать пищевые продукты. В этой связи в РФ в 2002 г введен обязательный стандарт на выявление листерий в пищевых продуктах – ГОСТ Р 51921-2002 «Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*».

Сущность метода заключается в высеве пищевого продукта в жидкую селективную среду с последующим пересевом выросшей культуры на агаризованные селективно-диагностические среды. Принадлежность бактерий, сформировавших колонии *L. monocytogenes* определяют по морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам.

Для предварительного обогащения используют следующие селективные среды:

- ПБЛ I питательный бульон для листерий;
- бульон Фразера полуконцентрированный.

Состав основы ПБЛ I (г/на литр):

Гидролизат казеина ферментативный	10,0
Пептон ферментативный мясной	15,0
Гидролизат автолизированных дрожжей	2,0
Натрия хлорид	3,5
Лития хлорид	3,0
pH 7,0±0,2	

Компоненты основы растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды, устанавливают pH 7,0 и стерилизуют при 121°C в течение 15 минут. перед использованием к 1 л основы добавляют с соблюдением правил асептики 4,44 мл раствора селективных компонентов (10 мл налидиксовой кислоты, 5 мг акрифлавина и 5 мг полимиксина В сульфата, растворяют в 10 мл стерильного физиологического раствора). Хранение готовой среды допускается не более 2 суток в темном месте при температуре не выше 8°C. При росте и размножении листерий в ПБЛ I наблюдают помутнение этой среды.

Бульон Фразера полуконцентрированный.

Состав основы среды (г/на литр):

Гидролизат казеина ферментативный	5,0
Пептический перевар животной ткани	5,0
Дрожжевой экстракт	5,0
Натрия хлорид	20,0
Калия дигидрофосфат	1,35
Динатрия гидрофосфат	12,0
Эксулин	1,0
Лития хлорид	0,5
Железа аммонийного цитрат	3,0
pH 7,2±0,2	

Компоненты основы растворяют при подогревании в 1 л дистиллированной воды, доводят рН до 7,2 и стерилизуют при температуре 121°C в течение 15 минут.

Перед использованием к 1 л основы среды добавляют асептически 10 мл раствора, содержащего селективную добавку – налидиксовую кислоту и акрифлавин.

При росте листерий в бульоне Фазера наблюдается почернение среды за счет гидролиза эскулина до глюкозы и эскулетин, который реагирует с ионами железа, образуя комплекс черного цвета.

Для выращивания колоний, характерных для листерий, применяют следующие селективно-диагностические среды:

- ПАЛ (питательный агар для листерий);
- Оксфордский агар.

Среда ПАЛ.

Основа среды состоит из нижеследующих компонентов (г/на литр):

Гидролизат казеина панкреатический	10,0
Гидролизат рыбной муки панкреатический	15,0
Гидролизат автолизированных дрожжей	2,0
Натрия хлорид	15,0
Железа аммонийного нитрат	0,5
Эскулин	0,8
Агар-агар	13,0
рН 7,2±0,2	

Компоненты основы растворяют при нагревании в 1 л дистиллированной воды, стерилизуют при 121°C в течение 15 минут. Затем добавляют из расчета на 1 л с соблюдением асептики 4 мл селективных компонентов (0,02 г налидиксовой кислоты, 0,01 г полимиксина В сульфата и 0,01 г акрифлавина растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды). Готовую среду разрешается хранить не более 22 суток при температуре не выше 8°C в защищенном от света месте.

Оксфордский агар

Пропись агара включает (г/на литр):

Пептон на основе мяса говяжьего	23,0
Кукурузный крахмал	1,0
Лития хлорид	15,0
Натрия хлорид	5,0
Эскулин	1,0
Железа цитрат аммонийный	0,5
Агар-агар	12,0

Эту пропись компонентов стерилизуют при 121°C в течение 15 минут. К 1 л стерильной и расплавленной основы среды добавляют селективные компоненты: 0,005 г акрифлавина, 0,02 г колистина, 0,4 г цик-

логексилида, 0,01 г фосфомицина, 0,002 г цефотетана, растворенные в 10 мл дистиллированной воды. Готовую среду в чашках Петри хранят не более 22 суток в темном месте при температуре не выше 8°C.

На среде ПАЛ рост листерий сопровождается почернением колоний и среды. На Оксфордском агаре через 24 часа инкубирования формируются колонии диаметром до 1 мм сероватого цвета, окруженные черным ореолом. Через 48 часов выращивания колонии увеличиваются до 2 мм в диаметре, приобретают темный цвет, имеют углубленный центр.

Для более убедительного признания принадлежности выросших колоний к бактериям рода *Listeria* из них делают посев на МПА с 1% глюкозы или триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом.

МПА с 1% глюкозы (г/на литр):

Пептон	10,0
Натрия хлорид	5,0
Глюкоза	10,0
Агар-агар	15,0
Мясная вода	1000,0
pH 7,2-7,4	

Среду стерилизуют при 115°C в течение 15 минут.

Триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (г/на литр):

Гидролизат казеина ферментативный	17,0
Пептон соевый	3,0
Натрия хлорид	5,0
Дрожжевой экстракт	6,0
Калия гидрофосфат	2,5
Глюкоза	2,5
Агар-агар	15,0
pH 7,3±0,2	

Компоненты среды растворяют в 1 л дистиллированной воды, устанавливают pH 7,3 и стерилизуют при 121°C 15 минут.

На МПА с глюкозой листерии образуют мелкие, сероватые, полупрозрачные колонии размером от 1,0 до 2,0 мм. На триптон-соевом агаре формируются выпуклые, бесцветные, непрозрачные колонии.

Определение лецитиназной активности проводят на среде ГРМ-1 следующего состава (г/на литр):

Панкреатический гидролизат рыбной муки	15,0
Панкреатический гидролизат казеина	10,0
Экстракт пекарских дрожжей	2,0
Натрия хлорид	3,5
Глюкоза	1,0
Агар-агар	10,0

Это коммерческая среда, которую готовят согласно прописи на этикетке. Перед стерилизацией в нее добавляют 5 г порошкообразного активированного угля. К стерильной среде добавляют желточную суспензию, которую готовят путем разведения желтка куриного яйца в 150

мл стерильного физиологического раствора. Затем суспензию вносят в количестве 5% в стерильную и охлажденную до 45-50°C питательную среду и разливают в чашки Петри по 20 мл. Аналогичным образом готовят среду, но без активированного угля.

Посевы бактерий производят на среды с активированным углем и среды, не содержащие его. Листерии гидролизуют лецитин только в присутствии активированного угля, что проявляется формированием вокруг колоний плотной зоны помутнения шириной от 3 до 6 мм.

Для определения β -гемолитической активности используют кровяной агар. Готовят его следующим образом. К 100 мл расплавленного и охлажденного до 45-50°C МПА с 1% глюкозы добавляют 5-10 мл дефибринированной крови животных, осторожно перемешивают и разливают в чашки Петри по 10 мл. Правильно приготовленная среда должна быть равномерно окрашена в красный цвет, рН среды - 7,2-7,4.

Посевы на этой среде инкубируют при 37°C в течение 24 часов. За это время на поверхности агара формируются колонии, вокруг которых наблюдаются зоны гемолиза.

7.8. Питательные среды для выявления и идентификации бактерий рода *Proteus*

Бактерии рода *Proteus* представляют собой грамтрицательные палочки размером 0,5x2,0 мкм. Иногда встречаются кокковидные и нитевидные формы. Они подвижны, спор и капсул не образуют. Протеи обладают высокой ферментативной активностью. Бактерии способны дезаминировать фенилаланин, образовывать сероводород, декарбоксилировать орнитин. В том случае, если бактерии не продуцируют индол и декарбоксилируют орнитин, их относят к *Proteus mirabilis*, а если образуют индол и не декарбоксилируют орнитин, их относят к *Proteus vulgaris*.

При санитарно-ветеринарном контроле пищевых продуктов определяют суммарное содержание всех бактерий рода *Proteus*. Протеи – условно-патогенные бактерии, могут вызывать пищевые токсикоинфекции и даже гнойно-воспалительные болезни (эндокардит, пиелонефрит, пневмония и др.)

При изоляции бактерий рода *Proteus* в пищевых продуктах, подготовленные из них пробы высевают в жидкую селективную среду с целью накопления микроорганизмов в этой среде. В состав жидкой селективной среды входят следующие ингредиенты (г/на литр):

Мясо-пептонный бульон	1000,0
Маннит	1,0
Желчь бычья натуральная	50,0
Дикалия гидрофосфат	0,8
Водный раствор кристаллического фиолетового с концентрацией 1 г/л	2,0
Спиртовой раствор бромтимолового синего с концентрацией 16 г/л	2,0
рН 6,9±0,1	

Среду необходимо стерилизовать текущим паром в течение 15 минут.

Перед применением к среде добавляют асептически 5 г мочевины в виде водного раствора (10 мл) и 100 000 ЕД полимиксина В сульфата или 120 000 ЕД полимиксина М сульфата. Готовая среда прозрачная желто-бурого цвета. На указанной среде посевы инкубируют 48 часов, а затем делают пересев на агар дифференциально-диагностический следующего состава (г/на литр):

Мясо-пептонный агар	1000,0
Дрожжевой экстракт	15,0
Маннит	1,0
Мальтоза	10,0
Желчь бычья натуральная	80,0
Железа (III) цитрат	2,0
Натрия тиосульфат	0,5
Кристаллический фиолетовый	0,04
Феноловый красный	0,05
Раствор полимиксина М сульфата	120000 ЕД

Среду стерилизуют текучим паром в течение 15 минут.

Бактерии из выросших на этой среде колоний пересевают на обычный агар, а затем микроорганизмы из колоний, выросших на обычном агаре, используют для определения их биохимических свойств.

Для выявления способности культур бактерий продуцировать индол их высевают в триптон-триптофановую среду, в состав которой входят (г/на литр):

Триптон или пептон	10,0
Натрий хлористый	5,0
DL-триптофан	1,0
Или L-триптофан	0,5
pH 7,5±0,1	

В день приготовления среду стерилизуют при 121°C в течение 15 минут. Образование индола определяют с помощью реактива Ковача после выращивания бактерий при 36°C в течение 48 часов.

Для выявления дезаминазы фенилаланина применяют среду следующего состава (на литр):

Дрожжевой экстракт	15,0
DL-фенилаланин	2,0
Динатрия гидрофосфат	1,0
Натрия хлорид	5,0
Агар-агар	12,0

Эту среду подвергают стерилизации в течение 10 минут при 121°C. Посевы выращивают в течение 48 часов при 36°C, после чего на поверхность среды наносят 3-5 капель раствора хлорного железа. Появление интенсивной зеленой окраски свидетельствует о дезаминазной активности бактерий.

Для выявления способности протеев декарбоксилировать орнитин используют среду следующего состава (г/на литр):

L-орнитин или	5,0
DL-орнитин	10,0
Дрожжевой экстракт	15
Глюкоза	1,0
Спиртовой раствор бромкрезолового пурпурного (10% раствор)	1,2
pH 6,9±0,1	

Среду стерилизуют при 121°C в течение 10 минут. Готовая среда светло-фиолетового цвета. Реакция считается положительной, если при росте бактерий среда приобретает фиолетовый цвет.

ГЛАВА 8. Питательные среды для оценки качества питьевой воды

Вода является естественной средой обитания многих видов микроорганизмов. Особую опасность представляют патогенные бактерии, которые могут быть в воде. Источниками контаминации воды патогенными микроорганизмами являются выделения больных животных и людей, трупы животных, сточные воды, особенно предприятий, перерабатывающих животное сырье. Патогенные микробы могут выживать в воде длительное время. Например, возбудитель сибирской язвы сохраняется в воде до 3 лет, возбудитель туберкулеза - до 1 года, бруцеллы – до 100 дней, а лептоспиры могут даже размножаться в воде. Естественно, что вода может стать источником распространения возбудителей инфекционных болезней, причиной возникновения эпидемий и эпизоотий.

Для выделения и количественного определения индикаторных бактерий в воде используют в качестве основных следующие методы:

- метод мембранных фильтров;
- титрационный метод;
- метод прямого обнаружения.

Сущность мембранного метода сводится к тому, что определенный объем воды фильтруют через мембранный фильтр, который затем помещают на плотную среду и выросшие бактерии идентифицируют по культуральным и биохимическим свойствам.

Титрационный метод основан на посеве воды в жидкую питательную среду с последующим пересевом на дифференциально-диагностические среды и проведением идентификации выросших бактерий.

При использовании метода прямого обнаружения бактерий определенный объем воды высевают на плотные среды, а затем проводят идентификацию выросших микроорганизмов с помощью известных микробиологических методов.

Контроль качества питьевой воды проводят с применением следующих питательных сред:

- питательный бульон;
- питательный агар;
- среда Эндо;
- лактозно-пептонная среда;
- полужидкая среда с лактозой;
- лактозно-пептонная среда с бромтимоловым синим;
- железосульфитный агар.

8.1. Питательные среды для определения общих и термотолерантных колиформных бактерий

Определение в питьевой воде общего числа мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов проводят с использованием питательного агара.

Питательный агар (г/на литр):

Панкреатический гидролизат рыбной муки	15,0
Панкреатический гидролизат казеина	10,0
Экстракт пекарских дрожжей	2,0
Натрия хлорид	3,5
Глюкоза	1,0
Агар-агар	15,0
pH 7,2±0,2	

Питательный агар стерилизуют при 121±0,1°C в течение 20-25 минут. На этот агар проводят посеvy воды и инкубируют их при 37°C в течение суток, а затем подсчитывают число колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 см³ исследуемой пробы.

Общие колиформные бактерии (ОКБ) и термотолерантные колиформные бактерии (ТБК) определяют титрационным и мембранным методами, однако наиболее востребованным является метод мембранной фильтрации. Пробы воды пропускают через мембранный фильтр, а затем помещают его на среду Эндо и выдерживают среду при 37°C в течение суток. Из выросших колоний извлекают бактерии и определяют их принадлежность к ОКБ и ТКБ. Для этого используют такие показатели, как оксидазная активность, ферментация лактозы до кислоты и газа.

Определение ферментации лактозы до кислоты и газа проводят на агаре нижеследующего состава (г/на литр):

Пептон	10,0
Натрия хлорид	5,0
Бромкрезоловый пурпурный	0,02
Агар-агар	4,0
pH 7,2-7,4	

Среду стерилизуют при 112°C в течение 12 минут. При ферментации лактозы до кислых продуктов цвет среды изменяется с фиолетового до желтого или желто-коричневого. Образование газов учитывают по разрывом в толще среды.

Выявление ТКБ проводят с использованием вышеуказанной среды, но выращивание посевов проводят при 44°C в течение суток.

Для выявления ОКБ и ТКБ используют титрационный метод, проводя посеvy в жидкую лактозо-пептонную среду следующего состава (г/на литр):

Пептон	10,0
Натрия хлорид	5,0
Лактоза	5,0
pH 7,4-7,6	

Среду стерелизуют при 112°C в течение 12 минут. Посевы инкубируют при 37°C в течение двух суток, где отмечен рост и газообразование, проводят высев на среду Эндо, которую для выявления ТКБ инкубируют при 44°C в течение 24 часов.

8.2. Определение колифагов в питьевой воде

Бактериофаги (греч. *phagos* – пожирающий) – это вирусы-паразиты про- и эукариот. Учение о фагах связано с именем канадского исследователя Ф. Д'Эрелля, который в 1917 году установил наличие в испражнениях больных дизентерией ультрамикроскопического агента, лизирующего шигелл. Он назвал его бактериофагом и предложил, что невидимый в световом микроскопе дизентерийный бактериофаг, накапливаясь в организме больных, благоприятствует их выздоровлению. Для доказательства этого предложения ученый использовал высококонцентрированные бульонные факторы холерного бактериофага для профилактики холеры в 1920 году во время эпидемии болезни в Индокитае.

Начатые Ф. Д'Эреллем работы привели к открытию других вирусов, лизирующих бактерий, микоплазмы, грибы, сине-зеленые водоросли. Их стали называть одним термином – фаги. Они, как и вирусы позвоночных, беспозвоночных и растений, по содержанию нуклеиновых кислот подразделяются на ДНК- и РНК-содержащие, а по характеру взаимодействия с бактериями – на вирулентные и умеренные. Вирулентные фаги, размножаясь в бульонных культурах, вызывают просветление помутневшей среды, а на агаровых газонах бактерий формируют бляшки или негативные пятна. Подобно колониям бактерий, морфология бляшек специфична для фагов. Типичными представителями вирулентных фагов являются колифаги Т-группы. Умеренные фаги взаимодействуют с бактериями в двух формах: одни штаммы или клетки популяции определенного вида они разрушают, а в другие проникают, но гибели не вызывают. Умеренный фаг, наследственные детерминанты которого объединились с бактериальными, называется профагом. Бактерии, содержащие профаг, называют лизогенными, а само явление – лизогенией.

Выход фага в окружающую среду сопровождается лизисом бактерий под влиянием фагового лизоцима.

Бактериофаги широко распространены в природе. Их обнаруживают во всех объектах окружающей среды, в которых обитают бактерии, грибы, микоплазмы, сине-зеленые водоросли. Установлено, что все патогенные виды микроорганизмов имеют специфичные для них фаги. Они найдены в почве, воде, в кишечнике человека и животных, в сточных водах различных предприятий и т.д. Бактериофаги являются индикаторами загрязнения водоемов бытовыми, сельскохозяйственными и промышленными стоками. Фаги патогенных микроорганизмов являются косвенным показателем инфицирования животных и человека. Бактериофаги патогенных микроорганизмов могут быть использованы для более полной характеристики санитарно-гигиенического состояния различных природ-

ных систем, в том числе и водоисточников, т.е. в качестве санитарно-показательного теста.

В частности, для контроля качества питьевой воды используют такой показатель, как наличие и наиболее вероятное число колифагов (НВЧ). Колифаги – бактериальные вирусы, способные лизировать *E. coli* и образовывать при 37°C через 18-20 часов зоны лизиса бактериального газона (бляшка) на плотной питательной среде.

Для выявления и определения (НВЧ) бляшкообразующих единиц (БОЕ) титрационным способом предварительно проводят накопление колифагов в среде обогащения на культуре *E. coli* с последующим выявлением зон лизиса бактерий на питательном агаре. На всех этапах исследований используется бактериальная взвесь *E. coli* в концентрации 10⁹ КОБ/мл.

В качестве среды обогащения применяют питательный бульон следующего состава (на литр):

Пептон	10,0
Натрия хлорид	5,0
Говяжий экстракт	10,0
pH 7,4±0,2	

Этот бульон представляет собой сухой коммерческий препарат, который выпускает фармацевтическая промышленность.

Посевы в питательном бульоне инкубируют при 37°C в течение 18-20 часов.

Определение колифагов в питьевой воде проводят прямым методом. Сущность его заключается в исследовании нормированного объема воды (100 см³) путем его прямого посева и последующего учета зон лизиса (бляшек) на газоне *E. coli* в чашках Петри на питательном агаре.

Для этого используют агар следующего состава (на литр):

Панкреатический гидролизат рыбной муки	15,0 г
Панкреатический гидролизат казеина	10,0 г
Экстракт пекарских дрожжей	2,0 г
Натрия хлорид	3,5 г
Глюкоза	1,0 г
Агар-агар	15,0
pH 7,2±0,2	

Среду стерилизуют при 121°C в течение 20-25 минут.

После посева воды на питательный агар и инкубации посевов при 37°C в течение 24-26 часов подсчитывают число колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 см³ исследуемой пробы.

Заключение

Микроорганизмы широко распространены в природе. Они составляют более одной трети живого вещества биосферы, и почти нет природных процессов, в которых эти существа не принимали бы активного участия. Современная наука считает, что первыми живыми организмами, появившимися в природе, были прокариоты, которые отличаются простотой строения по сравнению с многоклеточными организмами. Однако, несмотря на относительную простоту строения микробной клетки, ей присущ, как и всем живым существам, особый способ взаимодействия с окружающей средой - обмен веществ (метаболизм). Процессы ассимиляции (анаболизм) и диссимиляции (катаболизм) представляют собой совокупность взаимосвязанных реакций, протекание которых строго упорядочено во времени и пространстве. Упорядоченность обмена веществ достигается благодаря структурированности объема микробной клетки, т. е. наличия необходимых клеточных структур. На важность структурированности указывает следующий пример. Микопlasма по размеру превосходит атом водорода в 1000 раз, но даже в таком малом объеме осуществляется около 100 биохимических реакций, необходимых для жизнедеятельности этого микроорганизма. Для сравнения: жизнедеятельность клетки организма человека требует согласованного протекания более 10000 реакций.

Биохимические реакции обеспечивают осуществление сложных физиологических процессов, т.е. питания, дыхания, роста, размножения и других, которые изучают раздел микробиологии - физиологию микроорганизмов. Конечно же, знание физиологических процессов и их особенностей у разных видов бактерий является научно-теоретической основой и предпосылкой для получения качественных питательных сред, создания оптимальных условий для роста и размножения бактерий, конструирования аппаратов для лабораторного и, особенно, промышленного культивирования, достижения многих научно-исследовательских и практических целей.

По нашему мнению, всестороннее и углубленное изучение физиологии микроорганизмов, их биологических свойств является наиболее приоритетной задачей микробиологии, на основании решения которой можно будет более рационально оптимизировать состав питательных сред и условия культивирования бактерий.

Поэтому в книге значительное внимание уделено физиологии микроорганизмов. Довольно подробно описаны типы дыхания и питания бактерий, их рост и размножение, указана роль и значение ферментов в жизнедеятельности бактериальной клетки. Кроме этого, представлены основные физиологические функции важнейших элементов микробной клетки, ее химический состав и физико-химические свойства бактерий.

Основная часть монографии посвящена питательным средам, где приводятся общие сведения о питательных средах, предъявляемые требования к их качеству, дана классификация сред с учетом их консистенции и назначения.

Особое место в книге отведено приготовлению питательных сред в лабораторных и производственных условиях, получению гидролизатов и их назначению. В медицине и ветеринарии, животноводстве и звероводстве, микробиологии и вирусологии белковые гидролизаты используют с самыми разнообразными целями. Их применяют в вирусологии при получении питательных сред для развития и роста клеток почек телят, крольчат, эмбрионов свиней и коров. В биологической промышленности гидролизаты используют в качестве защитных сред при лиофильной сушке биопрепаратов, их применяют в составе растворителей некоторых лиофильно высушенных вакцин, в диетологии - для пищевых целей и для терапии животных и людей. Наиболее широкое применение гидролизаты получили в бактериологии при приготовлении питательных сред для микроорганизмов. Гидролизаты, применяемые для приготовления питательных сред, должны иметь в своем составе не менее восьми незаменимых аминокислот и не менее пяти полунезаменимых (оргинин, гистидин, глутамин, цистин, тирозин), а в остальном по аминокислотному и пептидному составу они не имеют строгих ограничений.

Для культивирования большинства производственных штаммов при изготовлении биопрепаратов в качестве амино-кислотно-пептидной основы питательных сред используют гидролизаты средней степени расщепления, а в случае выращивания прихотливых бактерий применяют гидролизаты высокой степени расщепления (глубокие гидролизаты).

Основным требованием, предъявляемым к гидролизатам, является обеспечение роста микроорганизмов в средах, приготовленных из них.

В значительной степени задача данной монографии – информировать специалистов биологического профиля об основных методах и приемах оценки качества питательных сред. Пригодность питательных сред может быть определена только после контроля их качества физико-химическими и биологическими методами, которые разрознены по многочисленным литературным источникам, учебникам и практикумам. Поэтому мы изучили доступный литературный материал, апробировали в лабораторных и производственных условиях методы контроля качества питательных сред, сосредоточив их в данной монографии. Эти методы могут быть использованы в практической работе специалистами ветеринарных лабораторий, микробиологами в сфере производства ветеринарных препаратов, сотрудниками научно-исследовательских и учебных учреждений.

Описанные в настоящей книге методики не ограничивают творческой инициативы исследователей и практических работников. По мере накопления сведений о более достоверных методах контроля качества питательных сред и их компонентов они могут уточняться и дополняться.

Качество сред оценивают на основании следующих показателей: величины рН, содержания общего белка, остаточного и аминного азота, свободного триптофана, углеводов, свободного индола, тяжелых металлов, стерильности. По этим же показателям оценивают и качество гидро-

лизатов, из которых готовят питательные среды.

Давно миновало время, когда микроскопия была стержнем всех видов микробиологических исследований. Ныне они основываются на применении питательных сред различного состава и целевого назначения. На смену простым средам, применявшимся на заре развития микробиологии для обнаружения в окружающей среде и биоматериале патогенов, разработаны специфические среды и селективные для определения групп и родов микроорганизмов. Поэтому в монографии мы приводим рецептуру питательных сред для выделения и идентификации энтеробактерий, кокковых форм микробов, анаэробов, для культивирования лептоспир, микроскопических грибов.

Значительное место в книге отведено данным относительно приготовления питательных сред из сырья различного происхождения, фильтрации сред, их расфасовке, осветлению, уплотнению и стерилизации. Также в монографии приведены краткие сведения о культивировании микроорганизмов в лабораторных и промышленных условиях.

В практической микробиологии при посеве конкретного биоматериала (гной, кровь, моча, мокрота и т.д.) выбор среды имеет большое значение, обуславливающее получение объективной информации, от которой зависит эффективное проведение санитарно-ветеринарных и лечебных мероприятий.

Поэтому мы приводим прописи питательных сред для посева крови, исследования мочи, выделения инфекта при болезнях органов дыхания и пищеварения.

Известно, что антибиотики широко применяют в ветеринарии и медицине для лечения больных животных и людей. Важным условием их рационального применения является определение чувствительности возбудителей болезни к конкретным антибиотикам. В связи с этим нами приведены среды наиболее эффективные для этой цели.

В процессе развития микробиологии, гигиены, эпидемиологии, эпизоотологии сформировалась и выделилась в самостоятельную науку – санитарная микробиология, которая занимается изучением микрофлоры окружающей среды, оказывающей влияние на здоровье человека, вопросами контроля санитарного состояния почвы, воды, воздуха, пищевых продуктов, предметов обихода и т.д. Однако, по нашему мнению, в учебных пособиях, практикумах, литературных источниках вопросы, касающиеся приготовления и применения питательных сред для санитарного контроля пищевых продуктов, раскрыты недостаточно полно.

Поэтому в книге большое внимание уделено питательным средам, предназначенным для санитарно-бактериологической оценки пищевых продуктов. Микрофлора пищевых продуктов является очень сложным объектом санитарной микробиологии, что объясняется следующими положениями:

- большим разнообразием этой микрофлоры и ее обилием;
- использованием при приготовлении многих пищевых продуктов

специфических видов микроорганизмов;

- применением пока еще малоэффективных методов индикации и выделения микроорганизмов.

Пищевые продукты могут быть фактором передачи многих возбудителей бактериальных болезней: эшерихиоза, сальмонеллеза, ботулизма, туберкулеза и других. Микроорганизмами, свидетельствующими о санитарном неблагополучии продуктов и воды, являются кишечные палочки, энтерококки, палочки протей, клостридии, листерии, шигеллы, стафилококки.

Для проведения санитарно-бактериологического исследования пищевых продуктов нужны качественные питательные среды. Способы выявления и подсчета количества живых клеток микроорганизмов, определения их типично-морфологических, биохимических, таксономических особенностей основывается на культивировании микрофлоры, содержащейся в исследуемых продуктах, на селективных питательных средах и условиях, благоприятных для размножения определенных видов микроорганизмов.

Патогены, попадающие в пищевые продукты, могут быть причиной многих болезней, которые по признакам и происхождению разделяют на две основные группы – пищевые инфекции и пищевые отравления.

Пищевые продукты, как правило, не бывают стерильными, поэтому среды для изоляции патогенных микроорганизмов из продуктов отличаются от базовых присутствием в их составе селективных добавок. Поэтому нами в главе 7 представлены прописи питательных сред для выделения и определения энтеробактерий, дрожжей, микромицетов, энтерококков, стафилококков, сальмонелл, листерий, клостридий, протей.

Считаем, что сконцентрированный в монографии материал имеет значимую познавательную и справочную ценность. Полагаем, что опубликованная книга явится достоянием гласности широкого круга читателей и будет полезной для преподавателей, студентов, магистрантов, аспирантов учреждений образования ветеринарного медицинского и биологического профилей, а также специалистов, занятых в сфере изготовления биопрепаратов различного назначения и практических работников профильных лабораторий.

Литература

1. Авитолизат кормовых дрожжей – нетрадиционная добавка / О. Голушко [и др.] // Животноводство России. – 2010. – № 4. – С. 51–52.
2. Акимов, Е. К. Микробиологические подходы к процессам культивирования культур микроорганизмов / Е. К. Акимов, А. К. Галиуллин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – Казань, 2013. – Т. 216. – С. 15–20.
3. Анисимова, Л. В. Контроль процесса глубинного культивирования кампилобактерий / Л. В. Анисимова // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1982. – С. 3–4.
4. Антонычева, М. В. Питательные среды для культивирования чумного микроба на основе сухого автолизата пекарских дрожжей, полученного по усовершенствованной технологии : автореф. дис. ... канд. медицинских наук : 03.02.03 / М. В. Антонычева. – Саратов, 2012. – 22 с. – Библиогр.: с. 21–22.
5. Артюшина, И. А. Гидролизаты из непищевого сырья как основа питательных средств для культивирования *Bacteroides nodosus* / И. А. Артюшина, Ю. Д. Караваев, С. П. Рогожин // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1987. – № 3. – С. 8–9.
6. Артюшина, И. А. Липидный состав гидролизатов из непищевого сырья / И. А. Артюшина, Е. И. Полупан, С. П. Рогожин // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1984. – № 7. – С. 6–8.
7. Ахапкина, И. Г. Питательные среды как искусственная среда роста и развития микроорганизмов / И. Г. Ахапкина, Л. П. Блинкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 6. – С. 99–104.
8. Ашикбаев, Н. А. Характеристика гидролизаторов из белоксодержащих отходов биопромышленности / Н. А. Ашикбаев, Ш. З. Злобина, С. М. Абабков // Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. – 1984. – № 11. – С. 58–60.
9. Бакланов, А. А. Низкая себестоимость и отличный вкус – одновременно! / А. А. Бакланов // Мясные технологии. – 2009. – № 2. – С. 14–15.
10. Бактериальные питательные среды на основе гидролизатов ферментолита биомассы микроорганизмов / А. Д. Чудинов [и др.] // Методы и средства диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней животных : сборник научных трудов / Всесоюзный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1985. – С. 132–135.
11. Балабанов, В. А. Питательная среда для культивирования дерматофилеза / В. А. Балабанов, И. А. Бакулов // Разработка, апробация и государственный контроль ветеринарных препаратов : тезисы докладов Всесоюзной научной конференции. – Москва, 1981. – С. 41.

12. Безотходная технология в промышленном производстве питательных сред / З. З. Султанов [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов Четвертой Всесоюзной конференции, Москва, 23–25 апреля 1991 г. / Всесоюзный научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Москва, 1991. – С. 153–154.
13. Бектемиров, М. А. Питательная среда для выращивания возбудителя копытной гнили овец / М. А. Бектемиров // Особенности профилактики и меры борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных и птиц в условиях Дагестана : сборник научных трудов / Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт, Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт. – Новочеркасск : СКЗНИВИ, 1987. – С. 39–45.
14. Белоусов, В. И. Испытание безбелковой среды для культивирования лептоспир / В. И. Белоусов // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов Четвертой Всесоюзной конференции, Москва, 23–25 апреля 1991 г. / Всесоюзный научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Москва, 1991. – С. 143–144.
15. Бендас, Л. Г. Кормовые дрожжи как исходное сырье питательных сред для культивирования микроорганизмов / Л. Г. Бендас, Н. В. Сидорчук // Лабораторное дело. – 1970. – № 1. – С. 43–45.
16. Берзинь-Берзит, Р. В. Гидролизаты непищевого яичного белка для питательных сред микроорганизмов / Р. В. Берзинь-Берзит // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов Четвертой Всесоюзной конференции, Москва, 23–25 апреля 1991 г. / Всесоюзный научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Москва, 1991. – С. 155–156.
17. Биологические свойства и анализ периодического культивирования пастерелл на разных питательных средах / М. Я. Ярцев [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1987. – № 3. – С. 1–4.
18. Биохимические свойства питательных сред для культивирования энтерококков / С. И. Цыганкова [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1987. – С. 141–142.
19. Борисова, Е. В. Биотехнологические основы получения чистой культуры дрожжей для предприятий малой мощности, выпускающих напитки брожения : автореферат дис. ... кандидата технических наук : 05.18.07 / Е. В. Борисова ; Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики. – Санкт-Петербург, 2015. – 16 с.
20. Бошьян, Е. Г. Сравнительная оценка питательных сред для культивирования производственных штаммов энтерококков / Е. Г. Бошьян, М. В. Романова, Е. Э. Школьников // Передовой научно-производственный

- опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1987. – № 5. – С. 1–3.
21. Буланов, П. А. Общая микробиология : учебное пособие для биологических факультетов университетов / П. А. Буланов, О. И. Колешко. – Минск : Вышэйшая школа, 1969. – 261 с. : ил.
 22. Булашова, Л. А. Биохимические показатели роста тест-штаммов микроорганизмов в среде с лактопептоном / Л. А. Булашова, С. П. Сергеева // Контроль, стандартизация и применение химиотерапевтических и биологически активных препаратов, кормовых добавок и премиксов : сборник научных трудов / Всесоюзный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов (ВГНКИ). – Москва, 1985. – С. 51–54.
 23. Варгина, А. К. Использование отходов консервного производства и медицинской практики для питательных сред в вакцинно-сывороточном деле / А. К. Варгина // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – 122 с.
 24. Варфоломеев, С. Д. Микроводоросли – источник биотоплива, пищевых, кормовых и лекарственных продуктов / С. Д. Варфоломеев, Л. А. Вассерман // Биотехнология. – 2011. – № 2. – С. 9–33.
 25. Великанова, Т. А. Оценка качества плотных питательных сред / Т. А. Великанова, Л. Я. Телишевская, И. А. Абрамов // Контроль, изготовление и применение средств терапии незаразных болезней животных : сборник трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1984. – С. 24–27.
 26. Великанова, Т. А. Сравнительная оценка различных образцов агара в составе плотных питательных сред / Т. А. Великанова, Л. Я. Телишевская // Контроль, изготовление и применение средств терапии незаразных болезней животных : сборник трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1984. – С. 79–81.
 27. Великанова, Т. А. Физико-химические свойства некоторых плотных питательных сред / Т. А. Великанова, Л. Я. Телишевская // Применение химиотерапевтических и белковых препаратов в животноводстве и ветеринарии. – Москва, 1986. – С. 79–83.
 28. Велямов, М. Т. Использование питательной среды из ферментативного гидролизата некондиционных куриных яиц для культивирования производственных штаммов на предприятии / М. Т. Велямов, Ж. К. Кенжеева, Ж. А. Кашаганова // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 3. – С. 86–89.
 29. Вербицкий, А. А. Влияние значения рН на рост пастерелл / А. А. Вербицкий, Р. Б. Корочкин, М. В. Грибанова // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы IV Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 19–20 мая 2005 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : УО ВГАВМ, 2005. – С. 30–31.

30. Вербицкий, А. А. Питательные среды и культивирование микроорганизмов / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 236 с. : ил. – Библиогр.: с. 224–238.
31. Вербицкий, А. А. Получение и контроль сыворотки гипериммунной против пневмонии свиней, содержащей антитела к *Pasteurella multocida* серотипов А, В, D и *Bordetella bronchiseptica* / А. А. Вербицкий // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2011. – Т. 47, вып. 1. – С. 23–26.
32. Верховин, П. Создание продукта, отвечающего требованиям рынка / П. Верховин // Мясные технологии. – 2015. – № 10. – С. 36–37.
33. Ветеринарная лабораторная практика / сост. Ф. М. Орлов. – Москва : Сельхозгиз, 1963. – Т. I. – 1963. – 568 с. : ил.
34. Ветеринарная микробиология : учебник для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по специальности «Ветеринария» / П. А. Емельяненко [и др.]. – Москва : Колос, 1982. – 304 с. : ил.
35. Ветеринарная микробиология : учебник для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по специальности «Ветеринария» / П. А. Емельяненко [и др.]. – Москва : Колос, 1982. – 304 с. : ил.
36. Ветеринарная микробиология и иммунология : учебник для студентов вузов по специальности «Ветеринария» / Н. А. Радчук [и др.] ; ред. Н. А. Радчук. – Москва : Агропромиздат, 1991. – 384 с. : ил.
37. Виестур, У. Э. Системы ферментации / У. Э. Виестур, А. М. Кузнецов, В. В. Савенков. – Рига : Зинатне, 1986. – 368 с.
38. Влияние вида белоксодержащего сырья на биологические свойства ферментативных гидролизаторов, используемых в составе микробиологических питательных сред / И. Н. Коновалова [и др.] // Рыбное хозяйство. – 2013. – № 4. – С. 129–131.
39. Влияние железосодержащего препарата на эффективность культивирования бактерий рожки свиней / Л. Я. Телишевская [и др.] // Аграрная наука. – 2015. – № 8. – С. 25–27.
40. Влияние концентрации монтмориллонит содержащего сорбента и рН питательной среды на чувствительность *Escherichia coli* к антибактериальным препаратам / Н. П. Зуев [и др.] // Ветеринарная патология. – 2014. – № 2. – С. 88–97.
41. Влияние пептидов из белковых панкреатических гидролизатов на рост микроорганизмов / Л. Я. Телишевская [и др.] // Сборник научных трудов / Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – Москва, 1995(1996). – Т. 58. – С. 3–10.
42. Влияние химического состава питательных сред на рост и свечение люминесцентных бактерий / Ш. Т. Сарбаканова [и др.] // Ветеринария. – 2014. – № 2/3. – С. 86–88.

43. Волина, Е. Г. Культивирование лептоспир в жидкой питательной среде с лизированной кроличьей кровью / Е. Г. Волина, Л. Е. Саруханова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 1. – С. 3–5.
44. Волкова, Е. А. Культуральные свойства энтеробактерий на диагностических средах / Е. А. Волкова // Ветеринария. – 2009. – № 2. – С. 26–29.
45. Волкова, М. В. Кормовые дрожжи по малоотходной технологии / М. В. Волкова // Кролиководство и звероводство. – 1999. – № 3. – С. 9.
46. Вопросы зоогигиены и ветеринарной санитарии при различных технологиях содержания животных : труды ВНИИВС / Всесоюзный научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии ; ред. В. С. Ярных. – Москва, 1987. – 144 с.
47. Вопросы зоогигиены и санитарной микробиологии в промышленном животноводстве : труды ВНИИВС / Всесоюзный научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии. – Москва, 1986. – 140 с.
48. Вопросы зоогигиены, дератизации и санитарной микробиологии в промышленном животноводстве : труды ВНИИВС / Всесоюзный научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии ; ред. В. С. Ярных. – Москва, 1983. – 128 с.
49. Воробьева, Л. И. Промышленная микробиология : учебное пособие для студентов биологических и технологических специальностей высших учебных заведений / Л. И. Воробьева. – Москва : Изд-во МГУ, 1989. – 294 с. : ил.
50. Гайдарбекова, Х. М. Получение и субкультивирование культур клеток из легкого плода буйволицы / Х. М. Гайдарбекова, Н. Р. Будулов, М. Н. Мусаева // Ветеринарный врач. – 2015. – № 5. – С. 55–58.
51. Галиакберова, Н. И. Оптимизация условий культивирования сальмонелл на питательной среде из ферментативного маточно-плацентарного гидролизата / Н. И. Галиакберова, А. М. Алимов, Х. Н. Макаев // Ветеринарная патология. – 2003. – № 1. – С. 147–149.
52. Гашилова, П. Ш. Высушивание питательных сред методом пеносушки / П. Ш. Гашилова // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности. – Москва, 1979. – С. 10–15.
53. Геворкян, Н. А. Плотная питательная среда для бактерий рожи свиней / Н. А. Геворкян, В. П. Шишов, Л. В. Соловьева // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – 119 с.
54. Генералов, И. С. Использование отходов сывороточного производства в качестве кормовых добавок / И. С. Генералов, Г. П. Куценко, В. И. Манухин // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1983. – № 5. – С. 12–13.
55. Гидролизат белков сыворотки молока для питательных сред клеточных культур / А. П. Простяков [и др.] // Ветеринария. – 1990. – № 7. – С. 67–69.

56. Гидролизаты из отходов сывороточного и глобулинового производства / Н. Г. Шептун [и др.] // Контроль, стандартизация и применение химиотерапевтических и биологически активных препаратов, кормовых добавок и премиксов : сборник научных трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1985. – С. 76–82.
57. Глубинное культивирование кампилобактерий в условиях производства / В. П. Шишов [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1985. – № 4. – С. 9–11.
58. Глубинное культивирование микроорганизмов для производства ветеринарных биопрепаратов : рекомендации / А. А. Вербицкий [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, кафедра микробиологии и вирусологии. – Витебск : ВГАВМ, 2013. –18 с. : рис. – Библиогр.: с. 14.
59. Головкина, Г. П. Ферментолизаты биомассы микроорганизмов – высокоэффективная белковая основа производственных и диагностических питательных сред в биотехнологии ветеринарных препаратов / Г. П. Головкина // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – 107 с.
60. «Голубая кровь» в биотехнологии [Эффективность применения кровезаменителя перфторана при культивировании микроорганизмов] / М. К. Бакулин [и др.] // Ветеринарная медицина. – 2006. – № 2/3. – С. 4–6.
61. Грибанова, М. В. Биохимические показатели перевара Хоттингера при различной продолжительности гидролиза / М. В. Грибанова, А. П. Медведев, Р. Б. Корочкин // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы IV Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 19–20 мая 2005 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2005. – С. 49.
62. Гурьянов, Н. И. Стерилизующая фильтрация культуральных питательных сред и сыворотки крови животных / Н. И. Гурьянов, В. А. Гурьянова // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 130–131.
63. Гюлушанян, К. С. Использование питательной среды на основе кукурузного экстракта в производстве чумной вакцины ЕВ : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.00.07 / К. С. Гюлушанян ; Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». – Саратов, 1994. – 24 с. : ил.
64. Даровских, С. В. Стимуляция выращивания сальмонелл в бульоне Хоттингера / С. В. Даровских // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы VI Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 24–25 мая 2007 года) / Витебская

- государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2008. – С. 89–90.
65. Демонстрационный образец: дрожжевые экстракты компании DSM // Мясные технологии. – 2009. – № 4. – С. 33.
 66. Денисова, С. В. Питательная среда для обнаружения гемолитических штаммов кишечной палочки / С. В. Денисова // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции / Всесоюзный научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Москва, 1987. – С. 121.
 67. Доморад, А. А. Сравнительная оценка качества питательных сред / А. А. Доморад, Г. Е. Афиногенов, М. В. Краснова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 10. – С. 22–23.
 68. Дремач, Г. Э. Влияние биологически активных веществ на накопление комплексного полисахаридсодержащего антигена сальмонелл / Г. Э. Дремач, А. В. Зайцева // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы IV Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 19–20 мая 2005 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2005. – С. 60–61.
 69. Дремач, Г. Э. Приготовление питательной среды для культивирования бактерий на основе мясокостной муки / Г. Э. Дремач, В. В. Зайцев // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства: материалы II Международной научно-практической конференции молодых ученых и преподавателей сельскохозяйственных учебных заведений и научно-исследовательских учреждений (г. Витебск, 22 мая 2002 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2002. – С. 85.
 70. Дрожжевые экстракты – здоровая альтернатива усилителям вкуса и аромата синтетического происхождения / О. Н. Красуля [и др.] // Мясной ряд. – 2013. – № 3 (53). – С. 54–59.
 71. Дрожжевые экстракты – здоровая альтернатива усилителям вкуса и аромата синтетического происхождения / О. Н. Красуля [и др.] // Мясная индустрия. – 2014. – № 6. – С. 22–26.
 72. Дрожжевые экстракты DSM от компании UTS // Мясные технологии. – 2009. – № 3. – С. 9.
 73. Дьяконов, Л. П. Гидролизаты белков сыворотки крови (ГСБК) для выращивания клеточных культур / Л. П. Дьяконов // Сборник научных трудов / ВГНКИ. – Москва, 1987. – С. 39–44.
 74. Дьяконов, Л. П. Культивирование клеток животных на усовершенствованной среде / Л. П. Дьяконов, А. Ф. Конюхов, Т. В. Гальнбек // Труды / Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии. – Москва, 1987. – Т. 64. – С. 17–20.
 75. Егорова, В. Н. Высушивание методом распыления питательных сред для культивирования бактерий / В. Н. Егорова // Передовой научно-

- производственный опыт в биологической промышленности. – Москва, 1976. – С. 31–33.
76. Ермишина, И. Г. Химический состав и биологические свойства белковых гидролизатов / И. Г. Ермишина, С. П. Сергеева, А. П. Простяков // Бюллетень ВИЭВ. – Москва, 1983. – Т. 49. – С. 74–77.
77. Ефимова, М. Е. Изучение ростовых свойств питательных сред на основе ферментативного казеиново-дрожжевого гидролизата / И. Е. Ефимова // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1981. – С. 14–16.
78. Жумаш, А. С. Усовершенствованная плотная питательная среда для культивирования микобактерий туберкулеза [Среда на основе яичной среды Гельберга с добавлением раствора инфезола] / А. С. Жумаш, Р. А. Аманжол // Ветеринария. – 2014. – № 2/3. – С. 96–99.
79. Заерко, В. И. Культивирование производственных штаммов лептоспир на ферментативной установке «Марибуши-500L» / В. И. Заерко, А. П. Сурмило, В. Г. Харченко // Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 219–222.
80. Заерко, В. И. Производство живых вакцин против сальмонеллеза животных на питательных средах из непищевого сырья : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / В. И. Заерко ; Всероссийский государственный НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – Москва, 1996. – 18 с.
81. Заерко, В. И. Промышленная технология изготовления бактериофагов / В. И. Заерко, Л. В. Лемешко // Актуальные проблемы повышения продуктивности и охраны здоровья животных / Ставропольский государственный аграрный университет. – Ставрополь, 2006. – С. 351–353.
82. Заерко, В. И. Внедрение усовершенствованных методов фильтрации в биологическом производстве / В. И. Заерко, С. Н. Луцук, М. Н. Веревкина // Вестник АПК Ставрополя. – 2015. – Спецвыпуск 1. – С. 6–10.
83. Заерко, В. И. Мобильность технологии производства биопрепаратов - основа успешной борьбы с инфекционными заболеваниями животных / В. И. Заерко, В. И. Ситьков // Вестник ветеринарии. – 1999. – № 3 (14). – С. 64.
84. Зайцев, В. В. Влияние состава питательной среды на патогенные свойства лептоспирозных бактерий / В. В. Зайцев // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2010. – Т. 46, вып. 1, ч. 1. – С. 73–76.
85. Зайцев, В. В. Оценка ростовой активности сывороточных и альбуминовых питательных сред / В. В. Зайцев // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2010. – Т. 46, вып. 1, ч. 1. – С. 76–79.

86. Зайцева, А. В. Изучение динамики биосинтеза полисахаридного антигена сальмонелл в средах различного состава / А. В. Зайцева // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2003. – Т. 39, ч. 1. – С. 164–166.
87. Зайцев, В. В. Питательная среда для культивирования лептоспирозных бактерий / В. В. Зайцев // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2005. – № 1. – С. 14–15.
88. Зайцева, В. В. Влияние состава плотной питательной среды на продуктивность дерматофитов / В. В. Зайцева, И. А. Красочко // Экология и животный мир. – 2015. – № 1. – С. 53–59.
89. Заяц, А. Е. Электроактиватор микробиологических процессов / А. Е. Заяц, В. И. Загинайлов // Механизация и электрификация сельского хозяйства. – 2006. – № 9. – С. 8–9.
90. Зельцер, А. Кормовая ценность грибного мицелия / А. Зельцер, А. Торев, А. Медведев // Зоотехния. – 2000. – № 6. – С. 21–22.
91. Злобина, Ш. З. Использование некондиционных перепелиных яиц для изготовления гидролизата / Ш. З. Злобина, Н. А. Ашикбаев, И. М. Мирнова // Контроль качества химиотерапевтических препаратов : сборник научных трудов / ВГНКИ. – Москва, 1987. – С. 53–56.
92. Изготовление вакцины против бруцеллеза из культуры штамма 19, выращенной глубинным методом в реакторе / Б. А. Никаноров [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1985. – № 4. – С. 3.
93. Изучение влияния компонентов питательной среды на рост сальмонелл / Л. А. Коротеева [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1991. – С. 144–145.
94. Изучение возможности использования гидролизатов, полученных из отходов биопредприятия / Н. А. Ашикбаев [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1978. – С. 12–13.
95. Изучение возможности использования рыбных гидролизатов при культивировании сальмонелл и пастерелл / А. С. Фоменко [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1991. – С. 172–173.
96. Изучение потребности пастерелл в свободных аминокислотах и углеводах при глубинном культивировании / Т. Я. Шкварук [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1984. – № 8. – С. 3–6.
97. Использование белковых отходов производства АТФ для получения гидролизатов / Л. Я. Телишевская [и др.] // Контроль, изготовление и применение средств терапии незаразных болезней животных : сборник научных трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1984. – С. 15–19.
98. Использование мясных отходов производства антирабической вакцины

- при изготовлении питательных сред для культивирования бактерий рожки / Ф. Д. Любич [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1980. – № 5. – С. 7–8.
99. Использование некоторых промышленных источников непищевого сырья для культивирования сибиреязвенных вакцин / М. В. Храмов [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1991. – С. 150–151.
100. Использование отходов глобулинового производства для изготовления гидролизатов / С. И. Цыганкова [и др.] // Контроль, стандартизация и применение химиотерапевтических и биологически активных препаратов, кормовых добавок и премиксов : сборник научных трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1985. – С. 62–66.
101. Использование отходов переработки крови животных для получения гидролизатов / С. П. Рогожин [и др.] // Применение химиотерапевтических и белковых препаратов в животноводстве и ветеринарии : сборник научных трудов / Всесоюзный контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1986. – С. 7–11.
102. Использование отходов производства при изготовлении сухой живой противостерильной вакцины / О. П. Косикова [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1979. – № 4. – С. 15–16.
103. Использование отходов сывроточного производства при культивировании пастерелл / А. С. Куршудянц [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1981. – № 5. – С. 31–33.
104. Использование питательных сред из непищевого сырья для культивирования вакцинных штаммов сальмонелл / А. П. Медведев, Н. В. Железняк, М. В. Грибанова, И. В. Зубарева // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 63-й научной сессии сотрудников университета, 27–28 марта 2008 года / Витебский государственный медицинский университет. – Витебск : ВГМУ, 2008. – С. 123–125.
105. Использование питательных сред, изготовленных на основе дрожжевых лизатов, для выращивания производственных штаммов *Cl. chauvoei* / А. Н. Шуплико [и др.] // Разработка методов контроля биологических препаратов и диагностических средств : сборник научных трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1989. – С. 79–84.
106. Использование стимулятора роста микроорганизмов для культивирования аттенуированных штаммов сальмонелл / И. К. Тутов [и др.] // Вестник ветеринарии. – 1996. – № 1. – С. 69–71.
107. Использование сухого белкового концентрата в качестве азотсодержащей основы бактериологических питательных сред / В. В. Доценко [и др.] // Ветеринария. – 1995. – № 10. – С. 29.

108. Испытание ферментализатов в качестве компонента и заменителя питательных сред для культивирования микроорганизмов / А. И. Заикина [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 108–109.
109. Исследование и разработка управляемых процессов культивирования стрептококков / А. А. Раевский [и др.] // Ветеринарная биотехнология : настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 200–203.
110. К вопросу применения волокнистых фильтровальных материалов для очистки биологических сред / А. В. Канарский [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1981. – С. 17–19.
111. Кабулова, М. Ю. Использование дрожжей местной селекции для производства микробного белка на питательной среде из горца сахалинского : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.00.32 / М. Ю. Кабулова ; Горский государственный аграрный университет. – Владикавказ, 2006. – 23 с.
112. Калягина, С. Ю. Создание питательной среды из отходов мясного сырья и оценка ее свойств / С. Ю. Калягина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 3. – С. 89–91.
113. Каменский, Н. И. Повышение выхода биомассы листерий из штамма АУФ при культивировании глубинным способом в реакторах / Н. И. Каменский, И. К. Тутов // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных. – Ставрополь, 1997. – С. 10–13.
114. Караченцева, А. И. Подвижные микроорганизмы – сенсоры высокочастотного электромагнитного и биологического поля / А. И. Караченцева, Ю. Н. Левчук // Биополимеры и клетка. – 1989. – Т. 5, № 4. – С. 76–83.
115. Карпов, А. А. Масштабирование процессов культивирования микроорганизмов / А. А. Карпов, Е. А. Рубан, А. Я. Самуйленко // Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 190–192.
116. Карпов, А. А. Технические и технологические характеристики биореакторов с механическим перемешиванием и аэрацией для культивирования микроорганизмов / А. А. Карпов, Е. А. Рубан, А. Я. Самуйленко // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов / Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти. – Щелково, 2004. – С. 65–70.
117. Каталог сухих микробиологических сред / под ред. М. М. Меджидова. – Махачкала, 1992. – 29 с.
118. Кисленко, В. Н. Ветеринарная микробиология и иммунология : практикум : учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности «Ветеринария» / В. Н. Кисленко. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2012. – 364 с. : рис.
119. Кисленко, В. Н. Ветеринарная микробиология и иммунология : учебник для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария» / В. Н. Кисленко, Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов ; ред.

- В. Н. Кисленко. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 752 с. : ил.
120. Кисленко, В. Н. Ветеринарная микробиология и иммунология : учебник для студентов вузов, обучающихся по специальности «Ветеринария». Ч. 1. Общая микробиология / В. Н. Кисленко, Н. М. Колычев ; ред. Е. В. Ярных ; Международная ассоциация «Агрообразование». – Москва : КолосС, 2006. – 183 с. : ил.
121. Кладовая добавок // Мясные технологии. – 2009. – № 5. – С. 57.
122. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и иммунология : учебник для студентов вузов по специальности «Ветеринария» / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов ; ред. Т. С. Молочаева. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : КолосС, 2006. – 432 с. : рис.
123. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и микология : учебник для студентов высших аграрных учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария» / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2014. – 623 с. : рис.
124. Коляков, Я. Е. Ветеринарная микробиология : учебник для ветеринарных вузов и факультетов / Я. Е. Коляков. – 3-е изд., доп. и испр. – Москва : Колос, 1965. – 432 с. : ил.
125. Коротеева, Л. А. Биологические испытания питательной среды на основе лактопептона при культивировании пастерелл / Л. А. Коротеева, М. Я. Ярцев, Н. И. Емельянов // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов V Всероссийской конференции, 14–17 мая 1996 г. / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 1996. – С. 124.
126. Коротеева, Л. А. Испытание питательной среды на основе ферментативного казеиново-дрожжевого гидролизата для культивирования кампилобактерий в производственных условиях / Л. А. Коротеева, А. С. Фоменко, Е. И. Атомончук // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1985. – С. 3–4.
127. Коротеева, Л. А. Питательные среды для культивирования кампилобактерий / Л. А. Коротеева // Бюллетень ВИЭВ. – Москва, 1983. – Т. 49. – С. 90–91.
128. Корочкин, Р. Б. Накопление адгезивных антигенов при культивировании эшерихий в жидких питательных средах / Р. Б. Корочкин [и др.] // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы VI Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 24–25 мая 2007 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2008. – С. 172–173.
129. Костенко, Ю. Г. Руководство по санитарно-микробиологическим основам и предупреждению рисков при производстве и хранении мясной продукции : руководство / Ю. Г. Костенко. – Москва : Техносфера, 2015. – 636 с. : рис., табл. – Библиогр.: с. 634–636.

130. Костенко, Т. С. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии : учебное пособие для студентов высших учебных заведений по специальности «Ветеринария» / Т. С. Костенко, Е. И. Скаршевская, С. С. Гительсон ; ред. Н. И. Емельянова. – Москва : Агропромиздат, 1989. – 272 с. : ил.
131. Кретович, В. Л. Введение в энзимологию / В. Л. Кретович ; Академия наук СССР, Институт биохимии им. А. Н. Баха. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Наука, 1974. – 352 с. : ил.
132. Культивирование вакцинных штаммов сальмонелл с использованием питательных сред из нетрадиционных источников сырья / В. В. Меньшенин [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 8. – С. 65–66.
133. Культивирование дерматофитов на питательных средах из непищевого сырья / В. Н. Алешкевич [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сборник научных трудов / Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. – Горки, 2008. – Вып. 11, ч. 2. – С. 183–189.
134. Культивирование листерий в среде на основе аминокислоты / Л. А. Коротева [и др.] // Листерииоз на рубеже тысячелетий : материалы Международного симпозиума. – Псков, 1999. – С. 112–113.
135. Культивирование пробиотического микроорганизма *Lactobacillus reuteri*: конструирование питательной среды / Т. А. Раскошная [и др.] // Молочная промышленность. – 2015. – № 4. – С. 26–27.
136. Культивирование сальмонелл в питательных средах на основе гидролизата сухого белкового концентрата / Е. Э. Школьников [и др.] // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 2014. – С. 155–159.
137. Культивирование сальмонелл в питательных средах на основе сухого белкового гидролизата / Л. А. Коротева [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 2005. – С. 329–333.
138. Курандо, Е. Э. Совершенствование бактериологической диагностики туберкулеза животных в условиях изменяющейся эпизоотической ситуации : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 06.02.02 / Е. Э. Курандо ; Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств и кормов для животных. – Москва, 2010. – 25 с.
139. Курилова, А. А. Разработка питательных сред на основе сырья растительного происхождения для культивирования возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.00.07 / А. А. Курилова ; Ставропольский государственный университет. – Ставрополь, 2009. – 19 с.

140. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований : учебник для фельдшерско-лабораторных отделений медицинских училищ / А. С. Лабинская. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : Медицина, 1972. – 480 с. : ил.
141. Ленченко, Е. М. Эффективность питательных сред для культивирования *Y. enterocolitica* и *Y. Pseudotuberculosis* / Е. М. Ленченко // Ветеринария. – 2004. – № 6. – С. 27–29.
142. Леонтьева, И. А. Биологические свойства эшерихий и сальмонелл, выращенных на разных питательных средах : автореф. дис... канд. биол. наук / И. А. Леонтьева ; Самаркандский СХИ им. В. В. Куйбышева. – Самарканд, 1988. – 20 с.
143. Макаев, Х. Н. Изучение влияния посевной дозы, аэрации и перемешивания на рост *Moraxella bovis* при глубинном культивировании / Х. Н. Макаев, Г. Н. Спиридонов, А. Р. Нургалиева // Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство / Башкирский государственный аграрный университет. – Уфа, 2014. – С. 79–83.
144. Максимюк, Н. Н. Использование протеолитических ферментов для получения белковых гидролизатов / Н. Н. Максимюк, Л. Я. Телишевская, А. А. Комаров // Ветеринария. – 1993. – № 7. – С. 28–30.
145. Малахов, Ю. А. Лептоспироз животных : монография / Ю. А. Малахов, А. Н. Панин, Г. Л. Соболева. – Ярославль : ДИА-пресс, 2000. – 584 с. – Библиогр.: с. 564–580.
146. Материалы исследований по оптимизации жидкой питательной среды для глубинного культивирования вибрионов / Л. А. Коротева [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1979. – С. 8–9.
147. Медведев, А. П. Питательная среда для культивирования пастерелл / А. П. Медведев, В. М. Жаков, А. А. Вербицкий // Ученые записки / УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2003. – Т. 39, ч. 1. – С. 167–168.
148. Медведев, А. П. Питательные среды для максимального накопления адгезивных антигенов и энтеротоксина эшерихий / А. П. Медведев, А. М. Юдасин // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2007. – Т. 43, вып. 2. – С. 86–88.
149. Медведев, А. П. Питательные среды и глубинное культивирование микроорганизмов / А. П. Медведев, В. М. Меньшикова // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2015. – № 2. – С. 47–50.
150. Медведев, А. П. Применение двухкомпонентной питательной среды для выращивания сальмонелл / А. П. Медведев // Ученые записки / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 1994. – Т. 31. – С. 120–122.
151. Меджидов, М. М. Использование непищевого сырья в производстве микробиологических сред / М. М. Меджидов, З. З. Султанов. – Махачкала, 1986. – 71 с.

152. Меджидов, М. М. Справочник по микробиологическим питательным средам / М. М. Меджидов. Москва, 2003. – 86 с.
153. Медицинская микробиология : учебное пособие для студентов медицинских вузов / Д. К. Новиков [и др.] ; под ред. Д. К. Новикова ; ВГМУ. – Витебск : ВГМУ, 2002. – 325 с. : табл.
154. Медицинская микробиология : учебное пособие для студентов медицинских вузов / Д. К. Новиков [и др.] ; Витебский государственный медицинский университет. – Витебск : ВГМУ, 2001. – 325 с. : табл.
155. Медуницын, Н. В. Вакцинология / Н. В. Медуницын. – Москва : Триадa-X, 1999. – 272 с. – Библиогр.: с. 269–272.
156. Методические рекомендации по контролю качества питательных сред для микроорганизмов / А. П. Медведев [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2006. – 16 с.
157. Методы общей бактериологии = Manual of methods for general bacteriology : пер. с англ. : в 3 т. Т. 1 / ред. Ф. Герхардт ; пер.: Е. Н. Кондратьева, Л. В. Калакуцкий. – Москва : Мир, 1983. – 536 с. : ил.
158. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний : учебное пособие / Е. П. Красноженов [и др.]. – Ростов н/Д : Феникс, 2006. – 301 с. : ил. – Библиогр.: с. 297.
159. Микробиология : учебник для студентов фармацев. и мед. вузов / А. А. Воробьев [и др.]. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Медицина, 1998. – 335 с. : ил.
160. Микробиология и иммунология : в 2-х ч. : для студентов сельскохозяйственных вузов по специальности «Ветеринарная медицина», «Зоотехния» / А. А. Солонко [и др.]. – Минск : Пион, 2002. – Ч. 1 : Общая микробиология и иммунология. – 248 с.
161. Микробиология и иммунология : учебник для студентов высшего сестринского образования / А. А. Воробьев [и др.] ; ред. А. А. Воробьев. – Москва : Медицина, 1999. – 464 с : ил.
162. Миронов, А. Ю. Основы клинической микробиологии и иммунологии : учебное пособие / А. Ю. Миронов, Г. Г. Харсеева, Т. В. Клюкина ; Ростовский государственный медицинский университет. – Ростов-на-Дону, 2011. – 248 с.
163. Мотузко, Н. С. Физиология дыхания : учебное пособие для ветеринарных врачей, зооинженеров, студентов ВГАВМ и слушателей ФПК / Н. С. Мотузко, В. В. Ковзов, В. К. Гусаков ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2004. – 64 с.
164. Мотыжева, И. В. Питательная среда на основе лактопептона для культивирования производственных штаммов *Cl. chauvoei* : автореферат дис. ... кандидата ветеринар. наук : 16.00.03 / И. В. Мотыжева ; Всесоюзный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1990. – 23 с.
165. Мурадова, Е. О. Микробиология / Е. О. Мурадова, К. В. Ткаченко. – Москва : Эксмо, 2009. – 336 с.
166. Нетрусов, А. И. Микробиология : учебник для студентов вузов, обу-

- чающихся по направлению подготовки бакалавра «Биология» и биологическим специальностям / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – 2-е изд., стер. – Москва : Академия, 2007. – 350 с. : ил.
167. Новая селективная среда для идентификации *Escherichia Coli* O157: H7 / Л. П. Титов, Л. Д. Газиумарова // *Здравоохранение*. – 2007. – № 11. – С. 22–24.
168. Новые методические подходы к обнаружению и количественному учету сальмонелл при исследовании водных объектов / В. В. Алешня [и др.] // *Гигиена и санитария*. – 2011. – № 1. – С. 92–95.
169. Новые фильтровальные материалы для биотехнологических процессов / А. В. Канарский [и др.] // *Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов V Всероссийской конференции, 14–17 мая 1996 г.* / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 1996. – С. 202–203.
170. Нуратинов, Р. А. Питательные среды для индикации и культивирования микобактерий / Р. А. Нуратинов // *Ветеринария*. – 2004. – № 3. – С. 24–27.
171. *Общая санитарная микробиология : учебное пособие* / Новосибирский государственный аграрный университет, биолого-технологический факультет ; сост. Л. А. Литвина. – Новосибирск : Изд-во НГАУ, 2014. – 131 с.
172. Оптимизация условий гидролиза белков сыворотки молока / С. П. Сергеева [и др.] // *Разработка методов контроля биологических препаратов и диагностических средств : сборник научных трудов* / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1989. – С. 94–102.
173. Опыт применения ферментативного гидролизата крови, как основы питательных сред при культивировании сальмонелл / В. С. Русалеев [и др.] // *Проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных*. – Владимир, 1997. – С. 189.
174. Орлова, О. Е. Особенности состава синтетических питательных средств для культивирования *Haemophilus influenzae* типа В с позиций современных представлений о метаболизме этих бактерий / О. Е. Орлова, Н. Е. Ястребова, С. И. Елкина // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2001. – № 3. – С. 111–117.
175. Осипова, М. В. Интенсификация процесса брожения методом электроно-ионной обработки (ЭИО) пивных дрожжей : автореферат дис. ... кандидата технических наук : 05.18.07 / М. В. Осипова ; Московский государственный университет пищевых производств (МГУПП). – Москва, 2007. – 25 с.
176. Отечественные питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов / Я. В. Подкопаев [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2015. – Т. 60, № 5. – С. 59–64.
177. Оценка качества гидролизатов из белоксодержащих отходов биопромышленности / Н. А. Ашикбаев [и др.] // *Применение химиотерапевтиче-*

- ских и белковых препаратов в животноводстве и ветеринарии : сборник научных трудов / Всесоюзный контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1986. – С. 3–7.
178. Оценка эффективности питательной среды из кислотно-термического гидролизата белков сыворотки молока / А. П. Простяков // Контроль, стандартизация и применение химиотерапевтических и биологически активных препаратов, кормовых добавок и премиксов : сборник научных трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1985. – С. 74–78.
179. Павлович, С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией : учебное пособие для студентов медицинских вузов / С. А. Павлович. – Минск : Вышэйшая школа, 2005. – 799 с. : ил.
180. Панкратова, К. Г. Определение показателей качества кормовых дрожжей (паприна) методом диффузной отражательной ИК-спектроскопии / К. Г. Панкратова, В. И. Щелоков // Аграрная наука. – 1999. – № 11. – С. 16–17.
181. Панышина, Е. Ф. Ростовые, дифференцирующие и ингибирующие свойства питательной среды для иерсиний / Е. Ф. Панышина, Л. П. Титов // Здоровоохранение. – 2007. – № 11. – С. 20–22.
182. Пенькова, Н. И. Изучение лактогенных свойств гидролизатов из нетрадиционного сырья природного происхождения в питательных средах и *in vivo* : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.02.03 / Н. И. Пенькова ; Ставропольский государственный университет. – Ставрополь, 2010. – 20 с.
183. Пептидный состав гидролизатов белков сыворотки молока / А. П. Простяков [и др.] // Применение химиотерапевтических препаратов в ветеринарии и разработка методов их контроля. – Москва, 1989. – С. 103–108.
184. Пептидный и аминокислотный состав гидролизатов ферментолізата биомассы микроорганизмов / Е. Г. Лавченко [и др.] // Разработка методов контроля биологических препаратов и диагностических средств : сборник научных трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1989. – С. 91–94.
185. Питательная среда для выращивания микроорганизмов / Г. Н. Максимова [и др.] // Сборник научных трудов / ВГНКИ. – Москва, 1987. – С. 116–117.
186. Питательная среда для выращивания эшерихий / В. В. Зайцев [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2011. – Т. 47, вып. 2, ч. 1. – С. 30–33.
187. Питательная среда для культивирования бактерий рожы свиней / В. П. Шишов [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1983. – № 3. – С. 10–14.
188. Питательная среда из некондиционного мяса для культивирования микроорганизмов / И. В. Соболева, А. В. Устимов, С. С. Ушаков, А. П. Медведев // Исследования молодых ученых в решении проблем животно-

- водства : материалы III Международной научно-практической конференции (г. Витебск, 30 мая 2003г.) / УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2003. – С. 217–218.
189. Питательная среда на основе сухого белкового концентрата (СБК) для культивирования сальмонелл / Л. А. Коротева [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 30-летию института, 8–9 июня 2000 г. / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 2000. – С. 174–175.
190. Питательные среды из непищевого сырья для культивирования вакцинных штаммов сальмонелл / А. П. Медведев [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2009. – Т. 45, вып. 1, ч. 1. – С. 160–162.
191. Питательные среды из непищевого сырья для культивирования штамма – продуцента томицида / В. Д. Артеменко [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 117–118.
192. Плеских, А. С. Сравнительное изучение некоторых питательных сред для выращивания *Clostridium perfringens* типа В / А. С. Плеских, Е. Г. Лавченко // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1979. – С. 5–10.
193. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология : учебное пособие для студентов медицинских вузов / О. К. Поздеев ; ред. В. И. Покровский. – 4-е изд., испр. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 765 с. : цв.ил, рис., табл., портр. – Библиогр.: с. 696–697.
194. Показатели качества питательных сред для микроорганизмов и их определение : рекомендации / А. А. Вербицкий [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, кафедра микробиологии и вирусологии. – Витебск : ВГАВМ, 2014. – 18 с. : табл.
195. Получение белковых гидролизатов из мяса волов-продуцентов гипериммунных сывороток / А. П. Медведев, Т. С. Воронова, Т. В. Фроленко, И. П. Кулешова // Ученые записки / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2002. – Т. 38, ч. 1. – С. 91–92.
196. Получение гидролизатов из отходов производства пищевого пепсина / Л. Я. Телишевская [и др.] // Контроль, изготовление и применение средств терапии незаразных болезней животных : сборник трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1984. – С. 88–90.
197. Получение питательных сред из непищевого сырья и определение их пригодности для практического применения : рекомендации / А. А. Вербицкий [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, кафедра микробиологии и вирусологии. – Витебск : ВГАВМ, 2014. – 14 с. – Библиогр.: с. 12.

198. Получение, свойства и применение препарата авиамин сухой / А. А. Комаров, А. П. Простяков, С. И. Цыганкова, Л. И. Трусова // Ветеринария. – 1991. – № 4. – С. 52–55.
199. Поляк, М. С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М. С. Поляк, В. И. Сухаревич, М. Э. Сухаревич. – Санкт-Петербург : ЭЛБИ-СПб., 2008. – 352 с. – Библиогр.: с. 347–351.
200. Практикум по микробиологии : для биол. специальностей вузов / М. Н. Пименова [и др.] ; ред. Н. С. Егоров. – Москва : Изд-во Московского университета, 1976. – 307 с. : ил.
201. Практикум по общей микробиологии : учебное пособие для студентов вузов по специальности «Ветеринарная медицина» / А. А. Солонко [и др.]. – Минск : Ураджай, 2000. – 280 с. : ил.
202. Практикум по частной микробиологии : учебное пособие для студентов сельскохозяйственных вузов по специальности «Ветеринарная медицина» / А. А. Солонко [и др.] ; ред. А. А. Гласкович. – Минск : Ураджай, 2000. – 250 с. : ил.
203. Промышленная микробиология : учебное пособие для студентов высших учебных заведений / ред. Н. С. Егоров. - Москва : Высшая школа, 1989. - 688 с. : ил. - Библиогр.: с. 677-687.
204. Промышленный способ изготовления сухой питательной основы микробиологических сред из куриных эмбрионов – отходов вирусных вакцин и диагностикумов / И. В. Нынь [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 123–124.
205. Простяков, А. П. Лактопентон – основа бактериальных питательных сред / А. П. Простяков, С. П. Сергеева, Л. А. Булашова // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 109–110.
206. Простяков, А. П. Лактопептон, его свойства и применение / А. П. Простяков, С. П. Сергеева, Л. А. Булашова // Ветеринария. – 1990. – № 3. – С. 60–62.
207. Простяков, А. П. Гидролизаты для питательных сред из непищевого сырья / А. П. Простяков, Л. Я. Телишевская // Ветеринария. – 1988. – № 5. – С. 60–63.
208. Простяков, А. П. Физико-химические свойства сухих гидролизатов белков сыворотки крови / А. П. Простяков, С. И. Цыганкова, Л. И. Трусова // Контроль, стандартизация и применение химиотерапевтических и биологически активных препаратов, кормовых добавок и премиксов : сборник научных трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1985. – С. 48–51.
209. Пяткин, К. Д. Микробиология (с вирусологией и иммунологией) : учебник для студентов медицинских институтов / К. Д. Пяткин, Ю. С. Кривошеин. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Медицина, 1980. – 512 с. : рис.

210. Разработка питательной среды на основе аминокислоты для культивирования листерий / Л. А. Коротеева [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов V Всероссийской конференции, 14–17 мая 1996 г. / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 1996. – С. 123.
211. Разработка промышленной технологии получения питательного бульона для культивирования микроорганизмов, жидкого из непищевого сырья / А. И. Мигунов [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1991. – С. 145–147.
212. Разработка технологии и испытание сухого белкового концентрата в качестве основы бактериологических питательных сред / В. В. Доценко [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов V Всероссийской конференции, 14–17 мая 1996 г. / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 1996. – С. 125–126.
213. Раскин, Б. М. Проблема питательных сред на современном этапе / Б. М. Раскин, Г. П. Калинина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1988. – № 6. – С. 84–88.
214. Результаты испытания питательной среды для кампилобактерий / О. Д. Складов [и др.] // Сборник научных трудов / Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов – Центр качества ветеринарных препаратов и кормов. – Москва, 2001. – Т. 62. – С. 185–189.
215. Римарева, Л. Дрожжи из зерновой барды – природный премикс / Л. Римарева, Т. Лозанская, Н. Худякова // Животноводство России. – 2013. – № 5. – С. 41.
216. Рыбалкин, П. В. Совершенствование изготовления гидролизатов белка для бактериальных питательных сред / П. В. Рыбалкин, Н. М. Потапов // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 112–113.
217. Сабгурова, В. В. Влияние питательных сред на рост некробактерий в суспензионных условиях культивирования / В. В. Сабгурова // Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 206–208.
218. Самуйленко, А. Я. Современные промышленные методы культивирования микроорганизмов и клеток животных при производстве биопрепаратов / А. Я. Самуйленко, Е. А. Рубан, А. Я. Дадасян // Материалы Международной юбилейной научно-практической конференции, посвященной 110-летию Курской биофабрики и агробиологической промышленности России / Курская биофабрика – фирма «БИОК». – Курск, 2006. – С. 194–198.

219. Санитарная микробиология : учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности «Ветеринария» / Р. Г. Госманов [и др.]. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2010. – 237 с. : рис., фото. цв.
220. Санитарная микробиология : учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению подготовки (специальности) 111801 – Ветеринария (квалификация (степень) «специалист») / Н. А. Ожередова [и др.] ; ФГБОУ ВПО Ставропольский государственный аграрный университет. – Ставрополь : АГРУС, 2014. – 180 с. : табл.
221. Санитарная микробиология : учебно-методическое пособие для студентов, обучающихся по специальности «Ветеринарная санитария и экспертиза», слушателей ФПКиПК / А. В. Сандул [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2010. – 91 с. : табл.
222. Санитарная микробиология и вирусология : учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности – Ветеринария и направлению подготовки – Ветеринарно-санитарная экспертиза / Н. М. Колычев [и др.] ; под ред. Н. М. Колычева ; Омский государственный аграрный университет, Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – Омск, 2009. – 295 с. : ил.
223. Санитарная микробиология пищевых продуктов : учебное пособие для подготовки бакалавров по направлению «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» / Р. Г. Госманов [и др.]. – 2-е изд., испр. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2015. – 559 с.
224. Свириденко, Г. М. Оптимизация состава питательных сред / Г. М. Свириденко, М. Б. Захарова, Н. П. Сорокина // Переработка молока. – 2016. – № 5. – С. 14–16.
225. Свириденко, Н. А. Возможности повышения эффективности культурального метода для выделения микобактерий туберкулеза / Н. А. Свириденко, Н. С. Боганец, Л. Т. Аппельганц // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – № 4. – С. 51–52.
226. Селективная питательная среда для кампилобактерий / Л. Я. Телишевская [и др.] // Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов : тезисы докладов Всероссийской научной конференции. – Москва, 2001. – С. 78.
227. Серебренников, В. М. Биосинтез альфа-ацетолактата у природного мутанта *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* B2103, лишённого альфа-ацетолактатдекарбоксилазы, в зависимости от состава среды / В. М. Серебренников, Л. Н. Котова, А. В. Глазунов // Биотехнология. – 2012. – № 3. – С. 20–31.
228. Сиволодский, Е. П. Селективно-дифференциальная питательная среда «*Shewanella* IRHLS Agar» для выделения бактерий рода *Shewanella* / Е. П. Сиволодский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – № 2. – С. 46–49.

229. Сидорчук, В. А. Паратуберкулез овец, коз и кроликов в экспериментальных условиях : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.02 / В. А. Сидорчук ; Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко. – Москва, 2010. – 29 с.
230. Система культивирования микроорганизмов / В. И. Заерко [и др.] // Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 110–113.
231. Скиба, Е. А. Технология производства дрожжей : учебное пособие / Е. А. Скиба ; Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, Бийский технологический институт. – Бийск, 2010. – 121 с.
232. Скичко, Н. Д. Гидролизаты животных белков - основа питательных сред для промышленного производства биопрепаратов : автореферат дис. ... доктора биологических наук : 03.00.06 / Н. Д. Скичко. – Москва, 1992. – 46 с. : ил.
233. Скичко, Н. Д. Физико-химические и биологические свойства гепатогидролизина / Н. Д. Скичко // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1980. – № 3. – С. 27–29.
234. Смирнова, Г. А. Изучение взаимосвязи пептидного и аминокислотного состава питательных основ с параметрами роста микроорганизмов / Г. А. Смирнова, В. А. Мельникова, Т. Н. Ратникова // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 146–147.
235. Смирнова, Г. А. Состояние и перспективы развития сырьевой базы производства питательных сред / Г. А. Смирнова // Журнал микробиологии. – 1991. – № 5. – С. 65–67.
236. Смирнова, Н. И. Ветеринарная микробиология : учебное пособие для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по специальности «Ветеринария» / Н. И. Смирнова. – Минск : Вышэйшая школа, 1979. – 224 с. : ил. – Библиогр.: с. 220–221.
237. Совершенствование технологии изготовления и контроля питательной среды для получения полианатоксина против клостридиозов овец / И. З. Злобина [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 115–116.
238. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред / А. П. Шепелин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60, № 6. – С. 63–65.
239. Создание продукта, отвечающего требованиям рынка // Мясные технологии. – 2014. – № 2. – С. 38–39.
240. Соляник, Т. В. Микробиология : курс лекций для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-74 03 01 Зоотехния / Т. В. Соляник, М. А. Гласкович, А. А. Гласкович ; Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. – Горки : БГСХА, 2014.

- Ч. 4 : Основы санитарной микробиологии. – 85 с. : ил.
241. Состояние производства современных фильтрующих материалов для биотехнологии / А. И. Гуславский [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 30-летию института, 8–9 июня 2000 г. / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 2000. – С. 307–308.
242. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / ред. М. О. Биргер. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : Медицина, 1982. – 462 с.
243. Справочник по микробиологическим питательным средам / Науч.-произв. объединение «Питательные среды» ; под ред. М. М. Меджидова. – Махачкала : Даг. кн. изд-во, 1989. – 103 с.
244. Сравнительная оценка роста пастерелл на различных питательных средах / Н. И. Антонова [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов Четвертой Всесоюзной конференции, Москва, 23–25 апреля 1991 г. / Всесоюзный научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Москва, 1991. – С. 160–161.
245. Сравнительная характеристика питательных сред для выделения коринебактерий / А. П. Шепелин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 1. – С. 59–64.
246. Сравнительное изучение ростовых свойств дрожжевых экстрактов / А. С. Фоменко [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1987. – С. 111–112.
247. Среда для транспортировки патматериала / А. Ф. Лопыко [и др.] ; рук. работы А. П. Медведев // Студенческая наука и инновационное развитие : материалы 95-й Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов «Студенты – науке и практике АПК» (Витебск, 20–21 мая 2010 года). – Витебск : ВГАВМ, 2010. – С. 79–80.
248. Стабилизирующая среда высушивания для производства сухой живой вакцины против пастереллеза птиц / В. С. Ярных [и др.] // Ветеринария. – 1990. – № 1. – С. 63–64.
249. Субботин, В. В. Плотная селективная питательная среда для выделения моракселл / В. В. Субботин, Д. В. Карайченцев, В. Н. Карайченцев // Ветеринарная патология. – 2014. – № 2. – С. 27–31.
250. Султанов, З. З. Использование различных видов рыбного сырья в производстве микробиологических питательных сред / З. З. Султанов, А. З. Алиев, Е. А. Какулина // Рыбное хозяйство. – 2010. – № 5. – С. 84–86.
251. Султанов, З. З. Разработка и усовершенствование технологий получения микробиологических питательных основ и сред : автореферат дис. ... доктора биологических наук : 03.00.07 / З. З. Султанов ; Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН. – Махачкала, 2008. – 46 с.

252. Сыворотка молочная : получение производных компонентов / С. А. Рябцева [и др.] // Молочная промышленность. – 2013. – № 6. – С. 34–36.
253. Таварткиладзе, Н. И. Опыт получения на грузбиокомбинате комбинированного пептона из непищевых белков животного и растительного происхождения / Н. И. Таварткиладзе, Ц. А. Ментешашвили, З. А. Аганова // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1980. – С. 22–24.
254. Таллер, Л. А. Выделение атипичных микобактерий из биоматериала от лабораторных животных на модифицированной питательной среде / Л. А. Таллер, Г. М. Дюсенова, Т. А. Янченко // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – № 4. – С. 56–57.
255. Татарина, С. Д. Основные питательные среды, используемые в работе с энтеробактериями / С. Д. Татарина. – Москва, 1980. – 28 с.
256. Телишевская, Л. Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Л. Я. Телишевская ; Всероссийский государственный НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – Москва, 2002. – 58 с. : табл.
257. Телишевская, Л. Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / Л. Я. Телишевская ; под ред. А. Н. Панина. – Москва, 2000. – 295 с. : табл.
258. Телишевская, Л. Я. Метаболизм пептидов и аминокислот в культурах тест-штаммов микроорганизмов на разных питательных средах / Л. Я. Телишевская, Б. Е. Караваев, Е. Г. Аверьянова // Применение химиотерапевтических препаратов в ветеринарии и разработка методов их контроля. – Москва, 1989. – С. 108–111.
259. Телишевская, Л. Я. Сравнительное изучение гидролизатов мяса и непищевого белоксодержащего сырья / Л. Я. Телишевская, В. Е. Караваева, Е. Г. Аверьянова // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов III Всесоюзной конференции. – Москва, 1987. – С. 119–150.
260. Телишевская, Л. Я. Разработка методов гидролиза, способов применения и контроля качества белковых гидролизатов / Л. Я. Телишевская, С. П. Сергеева // Сборник научных трудов / Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов – Центр качества ветеринарных препаратов и кормов. – Москва, 2001. – Т. 62. – С. 240–249.
261. Технологическая обвязка биоферментов для выращивания микроорганизмов в стерильных условиях / В. И. Заерко [и др.] // Современные достижения биотехнологии. – Ставрополь, 1996. – С. 33–34.
262. Тимаков, В. Д. Микробиология : учебник для медицинских институтов / В. Д. Тимаков, В. С. Левашев, Л. Б. Борисов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Медицина, 1983. – 512 с.
263. Ткаченко, И. Н. Разработка и оценка качества новых питательных сред и стимуляторов роста микроорганизмов на основе активированных гидролизатов из молок рыб и вермикультуры : автореф. дис. ... кандидата био-

- логических наук : 03.00.07 / И. Н. Ткаченко ; Ставропольский государственный университет. – Ставрополь, 2009. – 18 с.
264. Толяронок, Г. Е. Интенсивность роста пастерелл, стрептококков и сальмонелл на питательных средах и себестоимость полученной на их основе биомассы / Г. Е. Толяронок, Ю. И. Тяпша, А. Ю. Финогенов // Эпизоотология. Иммунобиология. Фармакология. Санитария. – 2008. – № 4. – С. 9–17.
265. Трибуш, Л. С. Эффективность питательных сред при культивировании гемофилов / Л. С. Трибуш, Д. А. Петракова ; науч. рук. А. П. Медведев // Молодежь – науке и практике АПК : материалы 100 Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов, г. Витебск, 21–22 мая 2015 г. / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2015. – С. 101–102.
266. Тулякова, Т. В. Дрожжевые экстракты – безопасные источники витаминов, минеральных веществ и аминокислот / Т. В. Тулякова, А. В. Пасхин, В. Ю. Седов // Пищевая промышленность. – 2004. – № 6. – С. 60–62.
267. Тутов, И. К. Испытание новой питательной среды для микроорганизмов из органов лимфоидной системы / И. К. Тутов, В. А. Кравцов // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных : сборник научных трудов / Ставропольская государственная сельскохозяйственная академия. – Ставрополь, 2001. – С. 31–32.
268. Универсальная среда для микобактериоподобных микроорганизмов / М. О. Баратов [и др.] // Ветеринарный врач. – 2016. – № 3. – С. 32–37.
269. Уонг, Д. Ферментация и технология ферментов / Д. Уонг, А. Демайн. – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 355 с.
270. Фараджаева, Е. Д. Производство хлебопекарных дрожжей / Е. Д. Фараджаева, Н. А. Болотов. – Санкт-Петербург : Профессия, 2002. – 168 с.
271. Федосеенко, В. А. Применение гидролизатов соевой муки и кормового концентрата лизина в качестве основ питательных сред для культивирования микроорганизмов / В. А. Федосеенко, А. А. Сидорчук, В. А. Есепенок // Актуальные проблемы ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции : тезисы докладов 2 Международной научно-практической конференции. – Москва, 1997. – Ч. 2. – С. 168–169.
272. Физико-химические и биологические свойства гепатолизина / Н. Д. Скучко [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1976. – С. 27–29.
273. Физико-химические свойства гидролизатов крови как основы культуральных питательных сред / С. И. Цыганкова [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1987. – С. 148.
274. Фильтровальные пластины на безасбестовой основе / А. И. Гуславский [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тезисы докладов V Всероссийской конференции, 14–17 мая 1996 г. / Всероссийский научно-

- исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 1996. – С. 204.
275. Фильтровальный картон для осветления и стерилизующей фильтрации препаратов / В. М. Попова [и др.] // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов : материалы международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию института, 9–10 декабря 2009 г. / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. – Щелково, 2009. – С. 430–431.
276. Фоменко, А. С. Изучение возможности замены крови в плотных средах для определения жизнеспособности пастерелл / А. С. Фоменко, Л. А. Коротеева // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1987. – С. 120.
277. Фробишер, М. Основы микробиологии = Fundamentals of microbiology : пер. с англ. / М. Фробишер ; пер. В. А. Шорин. – Москва : Мир, 1965. – 678 с. : ил.
278. Хабаров, А. К. Оптимизация состава питательных сред для культивирования гемофильных бактерий / А. К. Хабаров // Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 69–70.
279. Ходр, Музнер. Питательная среда для культивирования сальмонелл / Ходр Музнер, А. П. Медведев // Исследования молодых ученых : материалы XI Международной конференции молодых ученых «Инновации в ветеринарной медицине, биологии, зоотехнии», г. Витебск, 24–25 мая 2012 г. / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2012. – С. 120–121.
280. Храмцов, А. Г. Гидролизаты сывороточных белков / А. Г. Храмцов // Переработка молока. – 2011. – № 9. – С. 44–46.
281. Цыганкова, С. И. Усовершенствование технологии изготовления гидролизатов на основе отходов мясной промышленности / С. И. Цыганкова, В. И. Космына, Г. Г. Горбенко // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. – Москва, 1987. – С. 113–114.
282. Чудинова, А. Д. Биохимические свойства гидролизатов ферментолизата биомассы микроорганизмов / А. Д. Чудинова // Контроль, стандартизация и применение химиотерапевтических и биологически активных препаратов, кормовых добавок и премиксов : сборник научных трудов / Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1985. – С. 55–58.
283. Шепелин, А. П. Разработка технологии производства панкреатического гидролизата рыбной муки и конструирование на его основе бактериологических питательных сред : автореферат дис. ... доктора биологических наук : 03.01.06, 03.02.03 / А. П. Шепелин ; Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского. – Москва, 2013. – 45 с.

284. Шумилов, К. В. Питательная среда для идентификации кампилобактерий / К. В. Шумилов, К. В. Трубицкий, В. З. Бондаренко // Разработка методов проверки биологических свойств производственных штаммов микроорганизмов и диагностических препаратов : сборник статей / Всесоюзный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1983. – С. 46–49.
285. Экологическая безопасность биотехнологий производства ветеринарных препаратов / В. И. Ситьков [и др.] // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных. – Ставрополь, 1999. – С. 3–5.
286. Эпизоотология с микробиологией : учебное пособие для учащихся учреждений образования, реализующих образовательные программы среднего специального образования по специальности «Ветеринарная медицина» / В. В. Максимович [и др.] ; ред. В. В. Максимович. – Минск : ИВЦ Минфина, 2012. – 496 с. : ил., табл. – Библиогр.: с. 487–489.
287. Эффективная основа питательных сред для культивирования клеток / А. Ф. Карышева [и др.] // Ветеринария. – 1995. – № 9. – С. 34–35.
288. Яковлев, Т. Е. Получение белковых гидролизатов из отходов производства мозговой антирабической вакцины / Т. Е. Яковлев, Е. Г. Левченко, А. Д. Чудинова // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – Москва, 1983. – № 5. – С. 6–11.
289. Baker, C. G. J. Fluidization principles and applications to biotechnology / C. G. J. Baker, A. Margaritis, M. A. Bergougnou // Adv. Eiotchnol. – 1981. – № 1. P. 635.
290. Collins, C. H. Microbiological Methods / C. H. Collins, Patricia M. Lyne. – New York, 1976. – 256 p.
291. Effect of different auxins on in vitro rooting of Paulownia elongata propagated plants / E. Zayova [et al.] // Genetics and plant physiology. – 2014. – Vol. 4, № 3/4. – P. 155–162.
292. Evaluate the diversity of rumen bacteria on anaerobic culture with different cellulose enrichment medium and temperature in vitro / Zeng Yan [et al.] // J.China Agr.Univ. – 2013. – Vol. 18, № 6. – P. 148–152.
293. Ferenczy, L. Microbial protoplast fusion / L. Ferenczy // Genetics as a tool in microbiology / eds. S. W. Glover, D. A. Hopwood. – Cambridge : University Press, 1981. – P. 1–34.
294. Gacheva, G. New strain Haematococcus cf. pluvialis Rozhen-12 - growth, biochemical characteristics and future perspectives / G. Gacheva, P. Dimitrova, P. Pilarski // Genetics and plant physiology. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 29–38.
295. In vitro maintenance of IDE8 cells using two types of bovine serum / C. V. Bastos [et al.] // Arq.brasil.Med.veter.Zootecn. – 2007. – Vol. 59, № 2. – P. 543–546.
296. Lara, Mantilla C. Chemical analisys of the culture medium: Psidium araca, 25% p/v / Mantilla C. Lara // Arch.Zootecn. – 2008. – Vol. 57, № 217. – P. 79–82.
297. Ngo Thi Tuong Chau. Optimization of medium for the poduction of a novel aquaculture probiotic, Streptomyces sp. A1 using central composite design of response surface methodology / Ngo Thi Tuong Chau, M. Matsumoto, I. Miyajima //

- J.Fac.Agr.Kyushu Univ. – 2014. – Vol. 59, № 1. – P. 2532.
298. Nuclear transfer methods and vitamin C affect the in vitro development of ovine cloned embryos / Min Jiang-tao [et al.] // *Acta veter.zootechn.sinica*. – 2014. – Vol. 45, № 9. – P. 1410–416.
299. Paschold, H. A. Handling and presentation of data on fermenters with digital systems / H. A. Paschold // *Process Biochem*. – 1981. – Vol. 6, Issue 4. – P. 27–30.
300. Roels, J. A. The rheology of mycelial broths / J. A. Roels, J. Van Den Berg, R. M. Voncken // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1974. – Vol. 16, Issue 2. – P. 181–208.
301. The influence of nutrition media and temperature on *Sclerotinia sclerotiorum* development / I. Mikic [et al.] // *Agriculture*. – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 8–11.
302. Viesturs, U. E. Foam in microbiological processes / U. E. Viesturs, M. Z. Kristapsons, E. S. Levitans // *Microbes and Engineering*. – 1982. – Vol. 21. – P. 169–224.

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Метаболизм микроорганизмов, их физиология – научно- теоретическая основа конструирования питательных сред для микробиологической практики.....	5
1.1. Метаболизм микроорганизмов.....	5
1.2. Химический состав бактерий, их физико-химические свойства.....	6
1.3. Типы питания и дыхания бактерий.....	10
1.4. Рост и размножение бактерий.....	19
1.5. Ферменты микроорганизмов.....	24
1.6. Влияние на микроорганизмы физико-химических факторов.....	28
Глава 2. Питательные среды.....	34
2.1. Общие сведения о питательных средах и требования, предъявляемые к ним.....	38
2.2. Классификация питательных сред.....	41
2.3. Приготовление питательных сред.....	50
2.3.1. <i>Общие положения о гидролизе белков, назначении гидролизатов.....</i>	<i>50</i>
2.3.2. <i>Получение обычных сред из мяса в лабораторных условиях.....</i>	<i>56</i>
2.3.3. <i>Получение питательных сред из мяса для производственных нужд.....</i>	<i>58</i>
2.3.4. <i>Питательные среды из сырья различного происхождения.....</i>	<i>64</i>
2.3.5. <i>Фильтрация сред, их расфасовка.....</i>	<i>76</i>
2.3.6. <i>Стерилизация питательных сред.....</i>	<i>84</i>
2.3.7. <i>Краткие сведения о культивировании микроорганизмов.....</i>	<i>90</i>
Глава 3. Физико-химический и биологический контроль питательных сред.....	93
3.1. Определение pH.....	93
3.2. Определение содержания азота методом Кьельдаля.....	93
3.3. Определение остаточного азота.....	95
3.4. Определение содержания белка.....	95
3.5. Определение аминного азота.....	95
3.6. Количественное определение свободного триптофана по М.А. Пешков.....	96
3.7. Определение содержания углеводов.....	97
3.8. Биуретовая реакция.....	98
3.9. Определение содержания золы.....	99
3.10. Определение свободного индола.....	99
3.11. Определение содержания тяжелых металлов.....	99
3.12. Биологический контроль питательных сред.....	99
3.12.1. <i>Тест-микроорганизмы, порядок хранения и работы с ними.....</i>	<i>99</i>
3.12.2. <i>Определение чувствительности, скорости роста.....</i>	<i>100</i>
3.12.3. <i>Определение показателя эффективности.....</i>	<i>101</i>
3.12.4. <i>Определение стабильности основных свойств культур тест-штаммов.....</i>	<i>101</i>
Глава 4. Питательные среды для основных групп микроорганизмов.....	102
4.1. Среда для изоляции и идентификации энтеробактерий.....	102
4.2. Среда для анаэробных бактерий.....	105
4.3. Среда для микроскопических грибов.....	107

4.4. Среды для микобактерий.....	108
4.5. Питательные среды для микоплазм	110
4.6. Питательные среды для кокковых форм микроорганизмов.....	112
4.7. Среды для лептоспир.....	113
4.8. Среды для бордетелл.....	119
Глава 5. Питательные среды для исследования некоторых видов патматериала.....	121
5.1. Питательные среды для посева крови.....	122
5.2. Питательные среды для исследования мочи.....	126
5.3. Питательные среды для выделения инфекта при болезнях органов дыхания.....	127
5.4. Среды для изоляции патогенов при заболеваниях органов пищеварения.....	130
Глава 6. Питательные среды для определения чувствительности микроорганизмов к антисептикам.....	135
6.1. Среды для определения антибиотиков в лекарствах.....	137
Глава 7. Питательные среды для санитарно-бактериологической оценки пищевых продуктов.....	139
7.1. Среды для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.....	140
7.2. Питательные среды для выделения и определения энтеробактерий.....	142
7.3. Питательные среды для выделения дрожжей и микромицетов.....	144
7.4. Питательные среды для изоляции и идентификации энтерококков и стафилококков.....	144
7.5. Среды для выделения и индентификации сальмонелл.....	149
7.6. Среды для выявления и идентификации бактерий рода <i>Clostridium</i>	153
7.7. Среды для выделения и идентификации листерий.....	155
7.8. Питательные среды для выявления и идентификации бактерий рода <i>Proteus</i>	159
Глава 8. Питательные среды для оценки качества питьевой воды.....	162
8.1. Питательные среды для определения общих и термотолерантных колиформных бактерий.....	163
8.2. Определение колифагов в питьевой воде.....	164
Заключение.....	166
Литература	170

Научное пособие

Вербицкий Анатолий Анатольевич,
Медведев Александр Петрович

**СРЕДСТВА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ
ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Монография

Ответственный за выпуск А. А. Вербицкий
Технический редактор Е. А. Алисейко
Компьютерный набор А. К. Глод
Компьютерная верстка Е. А. Алисейко
Корректор Т. А. Драбо
Е. В. Морозова

Подписано в печать 05.03.2018. Формат 60×84 1/16.
Бумага офсетная. Печать ризографическая.
Усл. п. л. 12,50. Уч.-изд. л. 11,89. Тираж 100 экз. Заказ 1768.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 51-75-71.
E-mail: rio_vsavm@tut.by
<http://www.vsavm.by>