

**Р. Г. ГОСМАНОВ, Н. М. КОЛЫЧЕВ,  
Г. Ф. КАБИРОВ, А. К. ГАЛИУЛЛИН**

# **САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

Издание второе, исправленное

*ДОПУЩЕНО*

*УМО вузов РФ по агрономическому образованию в качестве учебного пособия  
для подготовки бакалавров по направлению «Технология производства и  
переработки сельскохозяйственной продукции»*



• САНКТ-ПЕТЕРБУРГ •  
• МОСКВА •  
• КРАСНОДАР •  
2015

ББК 36-1я73

Г 72

**Госманов Р. Г., Колычев Н. М.,  
Кабилов Г. Ф., Галиуллин А. К.**

**Г 72** Санитарная микробиология пищевых продуктов:  
Учебное пособие. — 2-е изд., испр. — СПб.: Издательство  
«Лань», 2015. — 560 с.: ил. — (Учебники для вузов.  
Специальная литература).

**ISBN 978-5-8114-1737-7**

Учебное пособие состоит из двух частей. В первой части приведены современные данные по общей микробиологии, изложены материалы о роли микроорганизмов в технологии производства и переработке сельскохозяйственной продукции, принципы и методы санитарно-микробиологических исследований продуктов питания животного происхождения: мяса, яиц, молока, рассмотрены микробиологические процессы бродительных производств, эпифитная микрофлора плодов и овощей, а также основные положения учения об инфекции и иммунитете.

Во второй части «Лабораторные занятия» — приведены методы микробиологического контроля качества готовой продукции и сырья животного происхождения при производстве и переработке сельскохозяйственной продукции.

В конце книги приведен словарь специальных терминов и тестовые задания.

Предназначено для студентов вузов, обучающихся по направлениям подготовки: «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», «Продукты питания животного происхождения», «Продукты питания из растительного сырья».

**ББК 36-1я73**

#### **Рецензенты:**

*Ф. Ш. ШАЙХУТДИНОВ* — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, зав. кафедрой растениеводства и плодовоовощеводства Казанского государственного аграрного университета;

*А. А. ШАЛАМОВА* — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры растениеводства и плодовоовощеводства Казанского государственного аграрного университета;

*Г. С. ШАРАФУТДИНОВ* — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, зав. кафедрой биотехнологии, животноводства и химии Казанского государственного аграрного университета;

*А. Б. МОСКВИЧЕВА* — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры биотехнологии, животноводства и химии Казанского государственного аграрного университета;

*М. К. ГАЙНУЛЛИНА* — доктор сельскохозяйственных наук, зав. кафедрой технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана.

#### **Обложка**

*Е. А. ВЛАСОВА*

© Издательство «Лань», 2015

© Коллектив авторов, 2015

© Издательство «Лань»,

художественное оформление, 2015

---

---

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	— аденозиндифосфорная кислота
БГКП	— бактерии группы кишечной палочки
ВИЭВ	— Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии
ВНИИМП	— Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности
ГПС	— глюкозопептонная среда
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕД	— единица действия
КМА	— количество мезофильных аэробов
МАФАнМ	— мезофильные факультативно-анаэробные микроорганизмы
МПА	— мясопептонный агар
МПБ	— мясопептонный бульон
МПЖ	— мясопептонный желатин
МППБ	— мясопептонный печеночный бульон
МППГГА	— мясопептонный печеночно-глюкозный глицериновый бульон
НТД	— научно-техническая документация
ОМЧ	— общее микробное число
ПГГА	— печеночно-глюкозный глицериновый агар
ПГГБ	— печеночно-глюкозный глицериновый бульон
РА	— реакция агглютинации
РНК	— рибонуклеиновая кислота
РП	— реакция преципитации

РСК	— реакция связывания комплемента
СПФ	— свободное от патогенных микробов животное
ЦНС	— центральная нервная система
<i>Bac.</i>	— <i>Bacillus</i>
<i>Bact.</i>	— <i>Bacterium</i>
<i>BCG</i>	— <i>Bacterium Calmett-Guerin</i>
<i>Cl.</i>	— <i>Clostridium</i>
<i>Ig</i>	— <i>Immunoglobulin</i>

---

---

# ВВЕДЕНИЕ

**М**икробиология — раздел биологических наук, изучающих мельчайшие, в большинстве своем одноклеточные, находящиеся на грани между растительным и животным миром существа — микроорганизмы (микробы), изучение которых возможно лишь при применении световых и электронных микроскопов.

Микробы представляют собой самостоятельную обширную группу низших, в большинстве своем одноклеточных организмов, генетически связанных с растительным и животным мирами. Для изучения этих организмов, видимых только при увеличении в сотни и тысячи раз, в микробиологии применяются специальные методы исследования.

Микробиология изучает строение, физиологию, биохимию, генетику и экологию микроорганизмов, их роль и значение в жизни человека, животных и продуктивности биосферы.

Своим успешным развитием микробиология обязана в первую очередь достижениям физики и химии, которые обогатили микробиологию оригинальными методами исследования, позволившими расшифровать некоторые особенности обмена веществ. Применение электронной микроскопии позволило изучить тонкую структуру бактериальной клетки, химия дала много новых аналитических методов исследования, что заставило пересмотреть пути и сущность энергетического обмена, химизм биосинтеза ряда веществ. В свою очередь микробиология

внесла ценный вклад в генетику, биохимию и молекулярную биологию. Использование микроорганизмов в качестве объектов генетических и биохимических исследований открыло новую эпоху в естествознании. С достижениями в микробиологии связано решение многих теоретических проблем общей биологии и медицины, а также ее широкое применение в народном хозяйстве. На микроорганизмах впервые была установлена роль ДНК в передаче наследственной информации, доказана сложная структура гена и зависимость мутационных процессов от изменений в структуре ДНК. Изучение биосинтетической деятельности микроорганизмов показало их способность к синтезу весьма ценных соединений, имеющих большое народнохозяйственное значение.

В сельскохозяйственных вузах введен новый курс «Технология производства и переработки продуктов сельского хозяйства», в программу которого входит изучение общей и специальной микробиологии. В представленном пособии даны материалы общей микробиологии, написанные по классической схеме, и материалы по специальной микробиологии, в которых описывается биосинтетическая роль микроорганизмов в технологических процессах производства и переработки продуктов сельского хозяйства.

# **РАЗДЕЛ I**

## **ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ**



## ПРЕДМЕТ, ЗАДАЧИ И ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

**Н**азвание науки, предложенное Э. Дюкло, состоит из трех греческих слов: *mikros* — малый, *bios* — жизнь, *logos* — учение, наука. Таким образом, микробиология является наукой о жизни микроскопических существ. Их можно рассмотреть только с помощью светового или электронного микроскопа.

Мир микроорганизмов сложен и разнообразен. Они широко распространены в природе. Они бывают полезными и вредными: одни из них разлагают остатки растений, трупы животных и тем самым очищают нашу Землю, другие после проникновения в живой организм вызывают болезни, причиняющие огромный вред человеку, животным и растениям.

Академик В. Л. Омелянский писал о микробах: «Поистине, они вездесущи... Незримо они сопутствуют человеку на всем его жизненном пути, властно вторгаясь в его жизнь то в качестве врагов, то как друзья. В громадном количестве они встречаются в пище, которую мы принимаем, в воде, которую пьем, и в воздухе, которым дышим».

Микробиология изучает систематику, строение, физиологию, биохимию, генетику и экологию микроорганизмов, распространение и роль в круговороте веществ, их роль и значение в природе, в частности в жизни человека, животных. Своим успешным развитием микробиология обязана в первую очередь достижениям физики и химии, которые обогатили микробиологию оригинальными методами исследования.

В свою очередь микробиология внесла ценный вклад в генетику, биохимию и молекулярную биологию. Микробиологи научились использовать широкие возможности клеток микроорганизмов и заставили их «работать» для получения нужных нам продуктов. Этим занимается микробиологическая промышленность, являющаяся стержнем современной биотехнологии. Принципиально новые возможности биотехнологии открываются с использованием методов генетической инженерии. Микроорганизмы, созданные методом геной инженерии, начинают производить вещества, им не свойственные, но нужные человеку.

Без всякого сомнения, сельское хозяйство XXI в. будет кардинальным образом отличаться от XX в. благодаря широкому внедрению достижений биотехнологии и геной инженерии.

Современная микробиология включает в себя ряд самостоятельных дисциплин: общую, медицинскую, ветеринарную, сельскохозяйственную, промышленную, космическую и др.

Среди других биологических дисциплин иммунология является относительно молодой наукой. Она изучает генетические, молекулярные и клеточные механизмы реагирования организма на чужеродные субстанции, в том числе на микроорганизмы.

Возникновение микробиологии как науки стало возможным после изобретения микроскопа. Первым, кто увидел и описал микроорганизмы, был голландский натуралист Антоний Ван Левенгук (1632–1723), который сконструировал микроскоп, дававший увеличение до 300 раз. Он установил, что микроорганизмы могут иметь

различные формы — шаровидные, палочковидные и извитые. Книга «Тайны природы, открытые А. Левенгуком», опубликованная в 1695 г., привлекла внимание ученых и побудила к изучению микроорганизмов. Открытие Левенгука положило начало возникновению микробиологии.

Период с конца XVII в. до середины XIX в. вошел в историю как описательный, или морфологический, который создал условия для перехода к физиологическому этапу в развитии микробиологии. Его основоположник — выдающийся ученый-химик Луи Пастер (1822–1895). Первые работы его были направлены на изучение природы брожения. Луи Пастер доказал, что причина брожения и гниения — микроорганизмы, выделяющие различные ферменты. Каждый бродильный процесс обусловлен своим специфическим возбудителем: гниение вызывается группой гнилостных бактерий, скисание молока — молочнокислыми бактериями и т. д. Изучая маслянокислое брожение, Пастер установил, что *Vac. butyricum* развивается при отсутствии кислорода, и тем самым открыл явление анаэробнозиса.

В 1865 г. Л. Пастер установил, что порча вина и пива вызывается попаданием в суло посторонних микроорганизмов или диких дрожжей, и предложил производить нагревание вина и пива при температуре до 100°C. Этот способ получил название пастеризация.

Одним из основоположников микробиологии наряду с Пастером был немецкий ученый Роберт Кох (1843–1910). Им разработаны методы микробиологических исследований (плотные питательные среды, методы окраски микробов). Кох выявил возбудителей сибирской язвы (1876), туберкулеза (1882), холеры человека (1883).

Начало развитию иммунологии положили знаменитые опыты английского врача Эдуарда Дженнера (1749–1823). Основоположником же современной иммунологии является Л. Пастер. Он на основании результатов исследований установил, что организм, после встречи с ослабленным возбудителем, становится невосприимчивым к вирулентным микробам того же вида.

Белика заслуга в развитии микробиологии и иммунологии И. И. Мечникова (1845–1916). Он создал фагоцитарную теорию иммунитета, в основу которой положена способность клеток организма противостоять инородным телам, а также установил антагонизм между молочнокислыми и гнилостными микробами. На принципе антагонизма он обосновал теорию долголетия и предложил для этого использовать простоквашу, которая впоследствии получила название «Мечниковской».

Дальнейшее развитие микробиологии связано с внедрением молекулярной биологии, т. е. молекулярно-генетическим периодом (1941–1950). Благодаря развитию молекулярной биологии и генетики в 1960–1970-х гг. появилась такая наука, как биотехнология. Биотехнологический период связан прежде всего с открытием антибиотиков в 1940–1950-е гг.

Большое значение в развитии микробиологии имеют работы российских ученых: Н. Ф. Гамалея, Л. С. Ценковского, С. Н. Виноградского, Н. А. Михина и др.

Задачами микробиологии и иммунологии являются: разработка новых и усовершенствование существующих микробиологических методов в биотехнологии, получение микробного белка, микробиологическая очистка канализационных вод, внедрение микробных препаратов, повышающих плодородие почвы.

## 1.1. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

В настоящее время уже описано более 3,5 тыс. видов бактерий и их число постоянно растет.

Процессом группирования множества организмов на основе учета их общих признаков занимается классификация. Все микроорганизмы делятся на *прокариоты* и *эукариоты*. К эукариотам относятся микроорганизмы, имеющие истинное ядро, а у прокариотов нет четкой границы между ядром и цитоплазмой, отсутствует ядерная мембрана.

К эукариотам относятся: микроскопические водоросли (кроме сине-зеленых), микроскопические грибы и дрожжи. К прокариотам относятся: бактерии, риккетсии, микоплазмы, хламидии, актиномицеты и сине-зеленые водоросли.

В настоящее время для классификации микробов используют комплекс признаков: фенотипические (морфологические, культуральные, физиологические и другие свойства), а также генотипические (физико-химические свойства ДНК).

В классификации для группирования родственных микроорганизмов используют следующие таксономические категории: царство, отдел, секция, класс, порядок, семейство, род и вид.

Во всем мире используют «Определитель бактерий Д. Берги», девятое издание которого вышло в 1997 г. В этой книге все прокариотические микроорганизмы объединены в царство *Procarvotae*, которое подразделяется на четыре отдела.

Названия родов, семейств, порядка, класса и царства состоят только из одного слова. А для обозначения вида микроорганизмов принята двойная (бинарная) номенклатура, которая включает в себя названия рода и вида.

Первое слово пишется с прописной латинской буквы и обозначает *род*, характеризующий какой-либо морфологический или физиологический признак либо фамилию ученого, открывшего этот микроб. Второе слово — *вид*, пишется со строчной буквы и представляет собой производное от существительного, дающего описание цвета колонии, источника происхождения микроорганизма, вызываемого им процесса или болезни и некоторые другие отличительные признаки.

Например, термин *Escherichia coli* указывает, что микроб открыл ученый Эшерих, *coli* — обитатель кишечника; *Bacillus anthracis* — термин бациллюс указывает на то, что микроб образует споры, *anthracis* — возбудитель

сибирской язвы; *Azotobacter chroococcum* — микроорганизм, который фиксирует атмосферный азот в своем теле.

*Вид* — это совокупность родственных микроорганизмов, имеющих общее происхождение и генотип, схожие морфологические, физиологические признаки и способных в определенных условиях вызывать одинаковые процессы.

*Штамм* — культура одного и того же вида, выделенная из разных объектов и отличающаяся незначительными изменениями свойств. *Клон* — это культура, полученная из одной клетки.

*Культура* — микроорганизмы, выращенные в пробирке с питательной средой в условиях лаборатории.

## 1.2. МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Бактерии (от *греч.* bacteria — палочка) — микроорганизмы с прокариотным типом строения, преимущественно это одноклеточные организмы. Бактерии не видимы невооруженным глазом. Поэтому для их изучения используют световые и электронные микроскопы. Величина микроорганизмов измеряется в микрометрах ( $1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$ ), а органеллы и элементы внутриклеточных включений бактерий, а также вирусы измеряются в нанометрах ( $1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$ ).

По форме клеток бактерии подразделяются на три основные группы: шаровидные, или кокки, палочковидные и извитые.

**Кокки** имеют шаровидную форму, их диаметр 0,7–1,2 мкм. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают: микрококки, стафилококки, стрептококки, тетракокки и сарцины.

**Палочковидные формы** характерны для большинства бактерий, имеющих длину от 1,6 до 10 мкм. В за-

висимости от вида микроба концы у них могут быть закругленные или заостренные.

Некоторые палочковидные бактерии в природе при неблагоприятных условиях для сохранения вида образуют одну очень прочную спору и переходят в состояние анабиоза, которое может продолжаться бесконечно долго. При благоприятных условиях спора прорастает в вегетативную форму и у нее восстанавливаются все физиологические функции. Все бактерии, образующие спору, называются «бациллы», при этом у одних диаметр споры не превышает поперечный диаметр вегетативной клетки (*Bacillus anthracis*), у других (*Clostridium tetani*) диаметр споры больше и они придают микробу вид барабанной палочки, теннисной ракетки или веретена, из-за последней весь род получил название *Clostridium*. Таким образом, некоторые палочки существуют в двух формах: *вегетативной* — при этом они активно питаются, размножаются, и *споровой*, когда они переходят состояние анабиоза, покрываются прочной оболочкой, выдерживают 3–6-часовое кипячение и сохраняются неопределенно долго в природе.

**Извитые формы** бактерии обладают спиральной симметрией. К ним относятся — вибрионы, спираиллы и спирохеты.

*Вибрионы* (от лат. *vibrio* — извиваюсь) напоминают по форме запятую. Есть сапрофиты и патогенные, такие как *vibrio cholerae*.

*Спириллы* (от лат. *spira* — изгиб) образуют 3–5 завитков. Обитают в пресной и морской воде. Преимущественно сапрофиты.

*Спирохеты* (от лат. *spira* — изгиб, греч. *chaite* — длинные волосы) — прокариоты спирально извитой формы. У патогенных спирохет выявляются два типа завитков: *первичные* — видимые в световом микроскопе, придающие ей вид букв «С» или «S» с утолщениями на концах, и *вторичные* — видимые только в электронном микроскопе, в виде микроспирали вокруг осевой нити. Из патогенных известными являются *Leptospira*, вызывающие лептоспироз животных и человека.

### 1.2.1. Строение бактериальной клетки

Клетка прокариотических организмов имеет сложное строго упорядоченное строение, для которого характерны процессы, свойственные всем живым организмам.

Структурные компоненты бактериальной клетки делят на основные и временные. *Основными* структурами являются: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами и различными включениями, нуклеоид; *временными* — капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки, эндоспоры, образующиеся лишь на определенных этапах жизненного цикла бактерий, у некоторых видов они отсутствуют полностью.

У прокариотической клетки структуры, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны, называют поверхностными (клеточная стенка, капсула, жгутики, ворсинки).

Термин «оболочка» в настоящее время используется для обозначения клеточной стенки и капсулы бактерий или только клеточной стенки, цитоплазматическая мембрана не входит в состав оболочки и относится к протопласту.

*Клеточная стенка* — важный структурный элемент бактериальной клетки, придает форму, располагается между цитоплазматической мембраной и капсулой; у бескапсульных бактерий — это внешняя оболочка клетки. Она обязательна для всех прокариот, за исключением микоплазм и L-форм бактерий. Выполняет ряд функций: защищает бактерии от осмотического шока, участвует в метаболизме.

Разный химический состав и строение клеточной стенки лежат в основе деления микробов на грамположительные и грамотрицательные организмы. Тинкториальные свойства бактерий имеют большое значение при классификации и определении вида.

*Капсула* — слизистый слой, расположенный над клеточной стенкой бактерии. Вещество капсулы чет-

ко отграничено от окружающей среды. В организме животного капсула защищает микробную клетку от фагоцитоза, а во внешней среде — от бактериофагов. У сапрофитной бактерии лейконостока наблюдается образование одной капсулы для многих клеток сразу. Такие скопления бактерий, заключенные в общую капсулу, называют *зооглеями*.

*Жгутики* — представлены тонкими, нитевидными структурами белковой природы. Их длина превышает длину бактериальной клетки в несколько раз и составляет 10–20 мкм. Нить жгутика — полый спиральный цилиндр диаметром 12–20 нм.

Количество жгутиков и места их локализации у бактерий разных видов неодинаковы, но стабильны для одного вида. В зависимости от этого выделяют следующие группы жгутиковых бактерий:

- монотрихи — бактерии с одним полярно расположенным жгутиком;
- амфитрихи — бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах;
- лофотрихи — бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки;
- перитрихи — бактерии с множеством жгутиков, расположенных по всей ее поверхности.

*Пили* (фимбрии, ворсинки) — прямые, полые белковые цилиндры толщиной 3–25 нм и длиной до 12 мкм, отходящие от поверхности бактериальной клетки. Встречаются у подвижных и неподвижных форм бактерий и видимы только в электронном микроскопе. На поверхности клетки количество их может быть до нескольких тысяч.

**Цитоплазматическая мембрана и ее производные.** Цитоплазматическая мембрана — полупроницаемая липопротеидная структура бактериальных клеток, отделяющая цитоплазму от клеточной стенки. Она является обязательным многофункциональным компонентом клетки.

*Цитоплазма* — содержимое бактериальной клетки, ограниченное цитоплазматической мембраной. Состоит из *цитозоля* — гомогенной фракции, включающей растворимые компоненты РНК, ферменты, продукты метаболизма, и *структурных элементов* — внутрицитоплазматических мембран, рибосом, включений и нуклеоида.

*Рибосомы* — органоиды, осуществляющие биосинтез белка. Состоят из белка и РНК, соединенных в комплекс водородными и гидрофобными связями.

**Нуклеоид.** Обладает функциями ядра, контролирует факторы наследственности и изменчивости. Он состоит из одной замкнутой в кольцо двуспиральной нити ДНК длиной 1,1–1,6 мкм, которую рассматривают как единичную бактериальную хромосому, или *генофор*. Нуклеоид у прокариот располагается в центре клетки, но он, в отличие от эукариотических клеток, не отделен от остальной части клетки оболочкой.

**Споры (эндоспоры) бактерий** — особое состояние покоящихся репродуктивных клеток, характеризующееся резко сниженным уровнем метаболизма и высокой резистентностью.

Бактериальная спора формируется внутри материнской клетки и называется эндоспорой. Способностью к образованию спор обладают преимущественно палочковидные грамположительные бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора, следовательно, это не способ размножения.

Основная функция спор — сохранение бактерий в неблагоприятных условиях внешней среды. Переход бактерий к спорообразованию наблюдается при истощении питательного субстрата, недостатке углерода, азота, фосфора, накоплении в питательной среде продуктов метаболизма и старении.

### 1.3. ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И СТРОЕНИЯ ДРУГИХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

#### 1.3.1. Актиномицеты

Актиномицеты (от *лат.* *actis* — луч, *myses* — гриб) — лучистые грибы. Эта группа микроорганизмов занимает промежуточное положение между бактериями и микроскопическими грибами. Они одноклеточные, как бактерии, но их тело (мицелий) состоит из тонких и длинных гиф-нитей (0,5–2 мкм), способных к истинному ветвлению. Диаметр нитей очень мал, как у бактерий, а длина достигает нескольких миллиметров. С грибами их объединяет способность образовывать органы спороношения и размножаться спорами.

На питательных средах актиномицеты образуют различные колонии, они могут быть пушистые, бархатистые, а также плотные и кожистые, срастающиеся с субстратом. Мицелий актиномицетов на питательных средах дифференцирован: одна часть погружена в субстрат (субстратный мицелий), другая — над субстратом образует воздушный мицелий. Колонии иногда издают характерный землистый запах. Многие виды актиномицетов продуцируют пигменты, поэтому питательный субстрат и их воздушный мицелий может быть окрашен в желтые, розовые, коричневые или черные цвета. На концах нитей воздушного мицелия образуются спораносцы, которые могут быть прямыми, спиральными и мутовчатыми.

В результате созревания мицелия происходит фрагментация нитей, каждый изолированный фрагмент покрывается плотной оболочкой и превращается в спору, которая отделяется от основного мицелия. Попадая в благоприятные условия, споры прорастают в вегетативные клетки и дают начало новому организму.

При изучении культуральных свойств колоний лучше рассматривать их при малом увеличении непосредственно на питательной среде в чашках Петри. Для приготовления препарата часть мицелия вносят в каплю воды на предметном стекле, другим стеклом распределяют мицелий тонким слоем, сушат, фиксируют и красят по Граму. Препарат изучают с применением иммерсионной системы микроскопа.

Кроме нитевидных форм, встречаются палочковидные и кокковидные актиномицеты. Строение актиномицетов аналогично строению грамположительных бактерий, клеточная стенка содержит пептидогликан и не имеет, как грибы, хитина и целлюлозы. Таким образом, у актиномицетов часть признаков как у бактерий (прокариоты, химический состав, строение), а часть — как у микроскопических грибов (нити-гифы, специальные органы размножения — спораносцы и споры).

Для актиномицетов характерен гетеротрофный тип питания и аэробный (окислительный) тип получения энергии, хотя встречаются также и анаэробы. Обитают преимущественно в почве, на поверхности растений, коже и слизистых оболочках животных. Играют важную роль в круговороте веществ и энергии, образовании почвы и повышении ее плодородия. Разлагают органические субстраты, в том числе недоступные для других микроорганизмов. Многие актиномицеты служат продуцентами антибиотиков, витаминов, аминокислот, ферментов. Большинство актиномицетов сапрофиты, но есть и патогенные. К ним относятся *Actinomyces bovis* — возбудитель актиномикоза крупного рогатого скота.

### 1.3.2. Риккетсии и хламидии

*Риккетсии* — облигатные внутриклеточные паразиты; полиморфные грамтрицательные микроорганизмы, имеющие форму коротких палочек с закругленными

ми концами или кокков размером  $0,2-0,6 \times 0,4-2$  мкм, иногда нитей длиной 40 мкм и более. Относятся к микроорганизмам, занимающим промежуточное положение между бактериями и вирусами. Подобно вирусам они являются внутриклеточными паразитами и не растут на искусственных питательных средах. Морфологические признаки аналогичны морфологии бактерий: клеточная стенка содержит пептидогликан, цитоплазматическая мембрана характеризуется высокой проницаемостью, имеют рибосомы, нуклеоид. Размножаются в цитоплазме, реже в ядрах пораженных клеток хозяина, поперечным делением, а нитевидной формы — делением.

Хорошо изучены риккетсии Провачека — возбудители сыпного тифа, паразитирующие в организме человека и клетках кишечника вшей, являющихся переносчиками этой болезни. Широкое распространение имеют риккетсии возбудители Ку-лихорадки, переносчиками которых являются клещи.

Таким образом, у риккетсий часть признаков как у бактерий (размеры, строение, способы размножения, химический состав), а часть — как у вирусов (строгий внутриклеточный паразитизм).

*Хламидии* — облигатные внутриклеточные паразиты, возбудители инфекционных болезней животных и человека. Это особая группа микроорганизмов со сложным циклом развития: в процессе развития они проходят две стадии: инфекционного элементарного тельца и репродуктивного инициального (ретикулярного) тельца. По морфологии — округлые, диаметром до 250–350 нм, т. е. на грани разрешающей способности светового микроскопа. Инфекции, вызванные хламидиями, установлены у птиц (орнитоз), у крупного рогатого скота и мелкого рогатого скота (пневмония, полиартрит), у свиней (бронхопневмония, перикардит). Культивируют хламидии на куриных эмбрионах, культурах клеток, белых мышах.

### 1.3.3. Микоплазмы

Микоплазмы — мельчайшие свободноживущие прокариоты без ригидной клеточной стенки. Роль клеточной стенки у них выполняет трехслойная цитоплазматическая мембрана толщиной 7,5–10 нм.

Они обладают выраженным полиморфизмом — от мелких сферических, эллипсоидных, кольцевидных клеток до нитевидных, ветвящихся мицелиальных форм, размером 0,6–30 мкм, проходят через бактериальные фильтры. Основным компонентом мембраны являются стерины, в цитоплазме располагаются рибосомы и нуклеоид. В связи с отсутствием клеточной стенки микоплазмы не синтезируют пептидогликан, являются грамотрицательными. Микоплазмы не чувствительны к антибиотикам, например к группе *Penicillium*, угнетающих синтез клеточной стенки. Микоплазмы можно культивировать в питательной среде, обязательно содержащей сыворотку крови лошади или крупного рогатого скота, витамины, глюкозу.

Патогенные микоплазмы вызывают плевропневмонию, маститы, воспалительные процессы урогенитальных органов.

### 1.3.4. Морфология и строение микроскопических грибов

Грибы — это хемоорганотрофные микроорганизмы с эукариотической клеточной организацией, лишены фотосинтетических пигментов, широко распространены в природе. Грибы относят к царству *Fungi*, включающему в себя около 120 000 видов. Наибольшее значение имеют микроскопические грибы, вызывающие порчу пищевых продуктов, кормов и патологию у животных и людей, — представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Candida*, *Coccidioides*, *Stachybotrys*, *Dendrodochium*.

Клетка всех грибов состоит из клеточной стенки, цитоплазмы с цитоплазматической мембраной и эндоплазматической сетью, митохондриями, рибосомами, включениями, вакуолями, ядра.

## Морфология грибов

У большинства видов вегетативное тело состоит из ветвящихся нитевидных клеток (гифов), образующих мицелий или грибницу. Нитевидные грибы (гифомицеты) условно называют плесневыми. Существуют и одноклеточные неветвящиеся грибы — дрожжи, дрожжеподобные.

В качестве критерия отличающего дрожжи от микроскопических грибов (плесеней), используют способность плесеней образовывать длинные, разветвленные нити-грифы.

У плесневых грибов различают *субстратный* мицелий, погруженный в питательную среду, и *воздушный*, возвышающийся над нею. Попадая в субстрат, гифы растут концевыми участками и ветвятся радиально от центра инокуляции к периферии, формируя колонию.

По строению мицелия плесневые грибы подразделяют на два класса.

**Низшие грибы (фикомицеты).** Этот класс характеризуется несептированным мицелием, который представлен одной сильно разветвленной гигантской клеткой без перегородок и с многочисленными ядрами.

**Высшие грибы (микомицеты).** Характеризуются септированным мицелием: гифы мицелия разделены перегородками (септы) на отдельные одноядерные или многоядерные клетки. Цитоплазма одной клетки сообщается с цитоплазмой соседней через пору в центре перегородки. У некоторых высших грибов (дрожжи) мицелий отсутствует, а вегетативное тело представлено отдельными клетками с клеточной стенкой. Если в процессе деления или почкования дрожжевые клетки не расходятся, то образуются скопления клеток, которые называют ложным мицелием (псевдомицелием).

## Размножение грибов

Различают вегетативный и репродуктивный способы размножения.

**Вегетативный способ.** Это размножение происходит без участия специальных органов, простым распадом измененного мицелия на обособленные клетки, которые способны при благоприятных условиях образовывать новый мицелий.

**Репродуктивный способ.** Это размножение при помощи специализированных органов, у микроскопических грибов может быть половым и бесполом.

*Бесполое размножение* осуществляют особые клетки, которые развиваются эндогенно (спорангиоспоры, зооспоры) или экзогенно (конидии).

Спорангиоспоры — с твердой оболочкой, образуются обычно у низших грибов внутри шарообразных спорангиев, находящихся на особых ответвлениях гифов — спорангиеносцах (*Mucor*).

Зооспоры формируются в зооспорангиях у низших грибов, приспособленных к водному или полуводному образу жизни. Зооспоры подвижны.

Конидии образуются у высших грибов на специализированных ответвлениях гифов — конидиеносцах. Конидии могут быть одноклеточными и многоклеточными, различной формы, окраски и разных размеров. Расположены одиночно или цепочками, а также в виде скоплений, образующих головку (хорошо известно строение *Aspergillus*, *Penicillium*).

*Половое размножение:* в результате слияния ядер двух клеток и последующего редукционного деления образуются специализированные гифы с органами полового спороношения — сумками (асками у аскомицетов и базидиями у базидиомицетов). Внутри аска развиваются аскоспоры, на поверхности базидий — базидиоспоры. К аскомицетам относят дрожжи, некоторые плесневые грибы; к базидиомицетам — шляпочные, головневые и др.

Грибы, способные к половому размножению, называют совершенными, развивающиеся без полового

цикла — несовершенными (*Deuteromycetes*). У совершенных грибов в цикле развития отмечены стадии бесполого и полового спороношения.

### **Особенности строения некоторых низших и высших грибов**

К типичным представителям фикомицетов (низших) относят грибы рода *Mucor* (головчатая плесень), он развивается в виде серого войлочного налета на продуктах растительного происхождения. Мицелий гриба пронизывает субстрат и частично стелется по его поверхности. Размножаются фикомицеты вегетативно, половым путем, а также репродуктивным бесполом, т. е. при помощи спор. От несептированного одноклеточного мицелия вверх отходят воздушные плодоносящие гифы — спорангиеносцы с округлым спорангием на конце, внутри которого развиваются многочисленные округлые эндоспоры (от *lat. endo* — внутренние) — спорангиоспоры. После созревания оболочка спорангий разрывается и эндоспоры попадают в окружающую среду.

К микромицетам (высшим) относят грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* и др.

У грибов рода *Penicillium* (кистевидная плесень) мицелий и конидиеносцы септированы, конидиеносцы в верхней части разветвленные, в виде кисти руки, образуют особые продолговатые клетки-метулы с многоэтажным нагромождением из мутовок, из которых отшнуровываются споры-конидии. Гриб *Penicillium* широко распространен в природе, обитает в почве, на стенах сырых помещений, кормах, является виновником порчи продуктов растительного происхождения (варенье, лимоны), отсыревших изделиях кожи, везде образуя пигментированный налет различных оттенков голубого, зеленого, белого цвета.

Грибы рода *Aspergillus* (леечная плесень) характеризуются септированным мицелием и несептированными стоячими конидиеносцами, на вершине которых фор-

мируются расширения в виде головки. По окружности булавовидного расширения расположены стеригмы, из которых по мере созревания выталкиваются цепочки конидий или экзоспоры. При микроскопии видны радиально расположенные цепочки спор, напоминающие струйки воды, вытекающие из лейки. Мицелий аспергилл может быть зеленым различных оттенков или черным, например гриб *Aspergillus niger*.

### Несовершенные грибы

Грибы, для которых характерно только бесполое размножение, относятся к классу *несовершенных* грибов (*Fungi imperfecti*). В природе широко распространены представители родов: *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Oidium*, *Catenularia*, *Phoma*. Несовершенные грибы имеют многоклеточный мицелий, но у них нет полового процесса и совершенной стадии спороношения. Размножаются бесполом путем при помощи конидий или вегетативно — участками гиф.

Среди грибов рода *Fusarium* есть сапрофиты, которые живут в почве и на растительных остатках, а патогенные паразиты, вызывают заболевания многих видов растений — увядание, гниль корней, плодов, полегание сеянцев древесных и кустарниковых пород, болезни семян.

При культивировании на питательной среде грибы рода *Fusarium* образуют войлочный септированный мицелий, обычно окрашенный в белый или розовый цвет, питательная среда под колониями имеет вишневый оттенок. На воздушном мицелии формируются макро- и микроконидии. Макроконидии веретенообразной или серповидной формы, внутри имеют перегородки и состоят из нескольких крупных клеток, а микроконидии — чаще одноклеточные, грушевидной формы.

Представителей рода *Alternaria* можно обнаружить в почве, на поверхности листьев картофеля, томата или капусты. Часто паразитируют на поверхности продуктов в виде пятен черной плесени. На питательной среде обра-

зуют черные колонии. При микроскопии препаратов из мицелия альтернарии можно обнаружить многоклеточные конидии, грушевидной или заостренно-вытянутой формы, располагающиеся по одной или короткими цепочками на боковых ветках вегетативных гиф, выполняющих функции конидиеносцев.

Грибы рода *Trichoderma* всегда можно обнаружить в почве. На питательной среде образуют сначала белые, затем зеленоватые колонии с войлочной поверхностью. При микроскопии препаратов, приготовленных из мицелия триходермы, видны прямостоячие, супротивно разветвленные конидиеносцы, на вершине которых гроздевидно собраны 10–20 одноклеточных бесцветных конидий.

*Cladosporium* — представитель этой плесени *Cladosporium herbarum* образует темные пятна на сыре, а *Cladosporium byturi* вызывает плесневение масла, сопровождающееся образованием темных пятен и прогорканием продукта. При микроскопии *Cladosporium* виден слабо развитый мицелий, на воздушных (боковых) ветках которого образуются крупные оливково-зеленые овальные и округлые конидии, группирующиеся в гроздевидные скопления. Эта плесень образует пигмент, вследствие чего под ее колониями появляются черные пятна.

*Catenularia* — один из видов этой плесени *Catenularia fuliginea*, так называемая шоколадная плесень, вызывает порчу сгущенного молока с сахаром, образуя мицелий в виде «пуговицы» шоколадного цвета. При микроскопии мицелия *Catenularia* видны мелкие блестящие шоколадно-коричневые конидии, отшнуровывающиеся от концевых нитей воздушного мицелия и образующие длинные цепочки.

*Phoma* — образует короткие конидиеносцы с бесцветными одноклеточными конидиями. Среди грибов этого рода имеются возбудители порчи различных пищевых продуктов, например *Phoma pigmentivora*, вызывающая порчу сливочного масла.

Некоторые из несовершенных грибов близки дрожжам, например *Monilia*, *Endomyces*, *Oidium*. Их еще называют дрожжевидными организмами.

Грибки из рода *Oidium* по своим морфологическим свойствам занимают переходное положение между дрожжами и плесенями. Например, широко распространенный вид *Oidium lactis* (*Geotrichum candidum*) развивается на поверхности кисломолочных продуктов в виде белой бархатистой пленки. Такая же пленка обычно появляется в аэробных условиях на поверхности квашеной капусты и огурцов. В процессе своей жизнедеятельности микроскопические грибки окисляют молочную кислоту до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , поэтому кислотность продукта снижается. В результате кисломолочные и квашеные продукты подвергаются порче, так как в нейтральной среде беспрепятственно начинают развиваться гнилостные бактерии.

### 1.3.5. Дрожжи

Дрожжи — безмицелиальные, не образующие хлорофилл одноклеточные организмы, относящиеся к царству *Fungi*, классу *Ascomycetes* (сумчатых грибов), для которых характерен гетеротрофный тип питания. Они широко распространены в природе, встречаются на поверхности листьев, фруктов и овощей, в почве и разнообразных субстратах, богатых легкобразимаемыми углеводами, и принимают участие в круговороте углерода.

Некоторые роды дрожжей патогенны для человека и животных. Они вызывают поражение слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и других органов с образованием беловатых пленок, поражение полости рта — криптококкоз, кандидамикоз (*Cryptococcus*, *Torulopsis* и *Candida*).

В качестве критерия, отличающего дрожжи от плесневых грибов, принимают во внимание отсутствие мицелия, т. е. каждая дрожжевая клетка существует совершенно обособленно. Правда, в некоторых случаях дочерняя клетка не отделяется от материнской и сама

образует почку. В результате почкования нескольких соединенных между собой клеток образуются их скопления или псевдомицелий.

## Морфология

Дрожжи бывают разных форм — чаще округлые, овально-яйцевидные, реже цилиндрические, неподвижные. Форма клеток может изменяться от условий внешней среды и возраста популяции. Величина дрожжевой клетки обычно колеблется в пределах 7–10 мкм, удлиненные формы могут быть и более 20 мкм. Цитоплазма дрожжей базофильна, по Граму красятся положительно.

Дрожжи относятся к эукариотным организмам, строение их клетки сходно со строением клетки микроскопических грибов. Дрожжи имеют клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану, цитоплазму, аппарат Гольджи, истинное ядро, ограниченное от цитоплазмы двухслойной мембраной, эндоплазматическую сеть, лизосомы, митохондрии, рибосомы, вакуоли. При обычной микроскопии и специальных методах окрашивания в цитоплазме можно обнаружить митохондрии, а также включения — капельки жира, гранулы волютина и гликогена, по наличию которых можно судить о возрасте культуры. У стареющих дрожжевых клеток появляются вакуоли.

В состав многослойной клеточной стенки дрожжей входят в основном гемицеллюлоза (до 60–70% сухой массы), небольшое количество белка, липиды и хитин. Клеточная стенка придает форму и предохраняет от воздействия различных факторов окружающей среды, служит осмотическим барьером, обуславливающим избирательную проницаемость для различных веществ. Из-за особенностей химического состава клеточной стенки различают хлопьевидные и пылевидные дрожжи. Клеточная стенка *хлопьевидных* дрожжей обладает способностью ослизняться, поэтому находясь в субстратной жидкости,

они склеиваются друг с другом, образуют хлопья и оседают на дно. К *пылевидным* относятся дрожжи, клеточная стенка которых не ослизняется, они не склеиваются, поэтому всегда находятся во взвешенном состоянии.

Температура при выращивании культуры дрожжей должна поддерживаться на уровне 30°C, а pH — в пределах 4,5–5,5.

Дрожжи по типу питания относятся к гетеротрофам, в качестве источника углерода они используют углеводы, спирты, различные органические кислоты.

По типу дыхания дрожжи относятся к факультативным анаэробам, которые в зависимости от условий развития способны переключаться с аэробного на анаэробный тип получения энергии. В анаэробных условиях у дрожжей происходит интенсивное спиртовое брожение.

При интенсивной аэрации дрожжевой массы процесс спиртового брожения замедляется, дрожжи ведут себя как аэробные организмы и начинают активно размножаться. В микробиологической промышленности интенсивную аэрацию дрожжевой культуры применяют для получения большой массы дрожжей, в домашнем обиходе хозяйки специально вымешивают (подбивают) тесто для насыщения его кислородом. В хлебопекарной промышленности дрожжи выполняют роль биологических разрыхлителей теста, так как при брожении и дыхании образуется  $\text{CO}_2$ , увеличивается пористость и объем теста при выпечке.

### **Размножение дрожжей**

Дрожжи размножаются делением, почкованием, а также спорообразованием, которое может быть бесполое и половое.

Наиболее распространенный способ бесполого размножения дрожжей — почкование. При почковании на поверхности клетки появляется постепенно увеличивающийся бугорок или почка (дочерняя клетка). В процессе почкования, продолжающемся при благоприятных

условиях около 2 ч, часть материнской цитоплазмы и генетического материала переходит в дочернюю. Почка увеличивается в размерах, полностью отшнуровывается от материнской клетки и сама становится самостоятельной. Размножение почкованием продолжается до тех пор, пока имеются благоприятные условия питания и роста. При неблагоприятных условиях среды почкование дрожжей замедляется или вовсе останавливается и некоторые клетки переходят в состояние покоя. Такие покоящиеся клетки (артроспоры) характеризуются плотной, часто двуслойной оболочкой и значительным содержанием запасных веществ (жира, гликогена). Попав в благоприятные условия, покоящиеся клетки начинают почковаться, как обычные клетки.

Имеются дрожжи, размножающиеся простым делением: в середине клетки появляется перегородка, которая и делит клетку пополам.

Бесполое размножение спорами наблюдается у многих видов дрожжей. Бесполое размножение чаще происходит при истощении питательной среды и обильном доступе воздуха. Споры могут формироваться без предварительного слияния двух клеток, сумки со спорами появляются непосредственно из вегетативных клеток. Так, перед споруляцией ядро дрожжевой клетки делится в зависимости от вида дрожжей на несколько частиц, каждая из которых покрывается оболочкой. Затем постепенно в клетке, как в сумке (аске), образуются аскоспоры.

Образованию спор половым путем предшествует слияние цитоплазмы и ядер двух дрожжевых клеток, в результате получается одна большая клетка — зигота. Из зиготы развивается сумка, в которой формируются чаще 2–4, реже до 12 спор. Споры дрожжей более устойчивы к неблагоприятным воздействиям окружающей среды, чем вегетативные клетки, но менее стойки, чем споры бактерий. Попав в благоприятные условия или на питательный субстрат, споры прорастают в вегетативные клетки.

Истинные дрожжи, размножающиеся спорообразованием, относят к классу сумчатых грибов (*Ascomycetes*) и к семейству сахаромицетов (*Saccharomycetaceae*), в составе которого наибольшее значение имеет род сахаромицес (*Saccharomyces*), объединяющий много видов, в том числе и культурные дрожжи (*Sacch. cerevisiae*, *Sacch. ellipsoideus*, *Sacch. lactis*, *Sacch. casei*), применяемые в пищевой промышленности.

В промышленности широко используются дрожжи рода *Saccharomyces*, который объединяет как дикие, или природные, штаммы, так и культурные, используемые в хлебопечении, спиртовой и пивоваренной промышленности, сельском хозяйстве и быту. Они характеризуются различными биологическими свойствами, способностью сбраживать различные углеводы, интенсивностью брожения, количеством и концентрацией образуемого спирта.

Род *Saccharomyces cerevisiae* — дрожжи округлой формы. Применяют их в промышленном производстве этилового спирта, хлебопечении, пиво- и квасоварении. В каждом производстве применяют свои, специфические расы данного вида дрожжей.

Род *Saccharomyces ellipsoideus* (*S. vini*) — дрожжи, как показывает название, эллипсоидной формы. Их используют преимущественно в виноделии, этот вид дрожжей также представлен многими расами.

Но эти и некоторые другие виды рода *Saccharomyces* при случайном попадании в сырье и пищевые продукты, содержащие легко сбраживаемые углеводы, вызывают их порчу — скисание и брожение.

Дрожжи рода *Debariomyces* являются возбудителями порчи колбасы, сосисок и других, богатых белком субстратов.

Некоторые роды дрожжей (*Cryptococcus* и *Candida*) патогенны для человека и животных, вызывают поражение слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и других органов (молочница, криптококкоз, кандидамикоз).

Дрожжи, не образующие спор (ложные дрожжи), включены в класс несовершенных грибов (*Fungi imper-*

*fecti*), в семейство *Nonsaccharomycetaceae*. Их называют дрожжеподобными или несовершенными дрожжевыми организмами. К семейству *Nonsaccharomycetaceae* относятся дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis* и *Mycoderma*.

Из аспорогенных дрожжей наибольшее значение имеют роды *Candida* и *Torulopsis*. Их многочисленные представители широко распространены в природе. Большинство из них не способно к настоящему спиртовому брожению, многие вызывают порчу пищевых продуктов и сырья промышленного значения.

Дрожжи рода *Torulopsis* имеют клетки округлой формы. Многие из них способны вызывать лишь слабое спиртовое брожение, отдельные виды их используют в производстве кумыса (*Torulopsis cumis*) и кефира (*Torulopsis kefir*). Имеются виды *Torulopsis*, которые образуют пигменты (красный, розовый, черный) и являются возбудителями пороков кисломолочных продуктов, квашеных овощей.

Дрожжи рода *Candida* имеют вытянутую форму и способны к образованию примитивного мицелия (псевдомицелия). Например, дрожжи *C. mycoderma*, окисляющие сахар и этиловый спирт в органические кислоты или в углекислый газ и воду, являются вредителями при производстве вина, пива, пекарских дрожжей. Эти дрожжи вызывают также порчу квашеных овощей, безалкогольных напитков и многих других продуктов.

### Использование дрожжей

Учитывая химический состав дрожжей (48–52% белков, 13% углеводов, 2–3% жиров, различные витамины), их используют для дрожжевания кормов, с целью обогащения их ценными белками, жирами, витаминами группы В. В связи с содержанием значительного количества ценных пищевых белков и витаминов группы В дрожжи используются как полезное дополнительное питание для ослабленных лиц (в виде жидких или сухих пивных дрожжей) при некоторых болезнях, связанных с нарушением обмена веществ и гиповитаминозами.

Культивируя дрожжи на дешевых источниках углеводов, можно получить богатые белком корма, используемые при откорме животных. На принципе накопления дрожжами ценных питательных веществ основано дрожжевание кормов.

Различают *культурные* штаммы дрожжей, используемые в промышленном виноделии и пивоварении. Они изучаются и хранятся в научно-исследовательских институтах, на каждый вид дрожжей имеется паспорт с описанием всех его морфологических, культуральных и ферментативных свойств, они являются собственностью этого предприятия и представляют коммерческую ценность. Чистые культуры дрожжей, используемые в промышленных целях, хранят в холодильнике-сейфе, приспособленном для хранения микробных культур при температуре 3–8°C. При длительном хранении чистой культуры ее периодически обновляют и пересевают в пробирки с питательной средой. Пересев чистых культур дрожжей на свежие питательные среды проводят 4 раза в год.

Культурные штаммы дрожжей полученные в результате многолетнего селекционного отбора и применения их в промышленном производстве, приобрели те или иные полезные качества.

Так, дрожжи винокуренного производства дают высокий выход спирта, а хлебопекарские дрожжи быстро размножаются и хорошо разрыхляют тесто. Пивные дрожжи осветляют пиво и придают ему приятный специфический вкус.

Культурные дрожжи, применяемые в промышленности, по характеру вызываемого ими процесса делятся на верховые и низовые. Верховые дрожжи вызывают брожение, идущее при повышенной температуре (17–30°C) и сопровождающееся выделением большого количества CO<sub>2</sub> с образованием пены. Сами дрожжи во время брожения поднимаются на поверхность. Наиболее ценными верховыми дрожжами являются *Saccharomyces cerevisiae* — пивные дрожжи. Эти дрожжи имеют много разновидностей, к ним относятся и хлебные дрожжи.

Низовые дрожжи во время брожения остаются на дне. Брожение, вызываемое этими дрожжами, идет более спокойно при низкой температуре (4–10°C). Важнейшим представителем этой группы является *Saccharomyces ellipsoides*, от которого ведут начало многочисленные расы винных дрожжей.

Так называемые *дикие* дрожжи широко распространены в природе, но излюбленным местом их обитания является поверхность плодов и ягод. Дикие дрожжи обладают более слабой бродильной способностью, вырабатывают меньше спирта и даже погибают при повышении его концентрации. Дикие штаммы дрожжей в промышленной микробиологии часто образуют продукты обмена, придающие неприятный вкус, и являются виновниками порчи ценного конечного продукта.

### 1.3.6. Вирусы

В зависимости от организма хозяина, где вирусы способны размножаться в естественных условиях, построена одна из классификаций вирусов, согласно которой их подразделяют на вирусы растений, вирусы животных и человека, вирусы членистоногих, вирусы бактерий (бактериофагов).

*Вирус* — мельчайший инфекционный агент, особая форма существования особой формы материи, не имеющая клеточную структуру, но обладающая инфекционностью и способностью к саморепродукции внутри живой клетки. Вирусы распространены всюду, где есть жизнь, где есть живая клетка. Размеры их составляют от 10 до 200 нм, поэтому их можно изучать только под электронным микроскопом.

Вирусы имеют корпускулярную структуру и определенную для каждого вида морфологию: палочковидную, шарообразную, кубоидальную и нитевидную. Основные компоненты вирусов — нуклеиновая кислота и белки. Вирусы, в отличие от других микроорганизмов, содержат лишь одну из нуклеиновых кислот — ДНК или РНК.

### 1.3.7. Фаги

Фаги — это вирусы микроорганизмов, они распространены в природе там, где обитают микроорганизмы: в воде, почве, молоке, организме человека и животных. Фаги имеют сложную структуру: головку округлой или овальной формы и длинный отросток, конец которого разветвляется на жгутики, выполняющие функции рецепторов. Таким образом, фаговая частица по форме напоминает головастика или сперматозоид. Размеры фагов колеблются от 2 до 200 нм. Фаговая частица состоит из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), образующей стержень, и белковой оболочки, обеспечивающей форму, а также в их составе обнаружены углеводы, липиды и ферменты.

Наибольшее распространение имеют фаги, лизирующие молочнокислые бактерии. Трудности борьбы с бактериофагами связаны с тем, что они более устойчивы к высоким температурам, чем поражаемые ими микроорганизмы. Многие фаги выдерживают нагревание до 75°C в течение 15 мин. Особенно высокую устойчивость к воздействию высоких температур проявляют бактериофаги в высушенном состоянии.

Бактериофаги могут сохраняться в течение длительного времени в условиях холодильника. Они устойчивы к дезинфицирующим средствам, применяемым на предприятиях пищевой промышленности.

Для уничтожения бактериофагов в воздухе производственных помещений и на поверхности оборудования эффективной мерой является облучение УФ-лучами.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие отличия имеют клетки прокариотов от клеток эукариотов?
2. Какие таксономические категории используются при классификации микроорганизмов?

3. Какая номенклатура используется для обозначения видов микроорганизмов?
4. Какое понятие вкладывается в термин «вид» микроорганизмов?
5. Что такое штамм?
6. Каковы особенности строения прокариотной клетки?
7. Какие вы знаете морфологические формы бактерий?
8. Каковы особенности строения актиномицетов?
9. Каковы морфологические особенности риккетсий и микоплазм?
10. В чем особенности строения микроскопических грибов?
11. На чем основана дифференциация плесневых грибов от дрожжей?
12. В чем заключаются биологические особенности бактериофагов?

# ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Ф**изиология микроорганизмов — раздел микробиологии, изучающий химический состав, процессы питания, дыхания и размножения микроорганизмов.

## 2.1. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ

### Вода

Основная составная часть бактериальной клетки приходится на воду — 75–85%, а сухое вещество составляет 15–25%. Часть воды находится в свободном состоянии, а часть — в связанном. *Связанная* вода входит в состав структурных элементов. *Свободная* вода служит дисперсной средой для коллоидов, растворителем для кристаллических веществ, источником водородных и гидроксильных ионов. Например, гидролитические процессы расщепления белков, углеводов и липидов происходят в результате присоединения к ним воды, а синтез белков, пептидов — из аминокислот, липидов —

из высших жирных кислот (ВЖК) и глицерина, крахмала, гликогена — из глюкозы сопровождается выделением воды.

Какие же химические элементы содержатся в микробной клетке? Ведущая роль принадлежит четырем органогенам — кислороду, водороду, углероду и азоту. В процентном соотношении к сухому веществу бактерии содержат: углерода — 45–55%, азота — 8–15%, кислорода — 30%, водорода — 6%.

### Минеральные вещества

Кроме органогенов, в микробных клетках находятся так называемые *зольные* элементы — минеральные вещества, составляющие от 3 до 10% сухого вещества микроорганизмов.

Химические элементы входят в состав различных органических веществ микробной клетки: в белки, углеводы, липиды, витамины, которые распределяются в сухом веществе.

### Белки

Это высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения, молекулы которых построены из аминокислотных остатков, соединенных между собой ковалентными пептидными связями.

Роль белков в жизни микроба важна и разнообразна: это основной структурный материал всех клеточных мембран, кроме того, они выполняют различные функции — каталитическую, двигательную, транспортную, защитную, гормональную, запасную и др.

Белки составляют 50–80% сухого вещества микробов. Различают два основных класса белков: протеины и протеиды.

## Углеводы

В бактериях их содержится 12–18% от сухого вещества. Это многоатомные спирты (сорбит, манит, дульцит); полисахариды (пентозы, гликоген, декстрин); моносахариды (глюкозы, глюкуроновая кислота и др.). Углеводы являются источником энергии в микробной клетке.

## Липиды и липоиды

Липиды — истинные жиры, липоиды — жироподобные вещества. Ряд микробов содержат липиды в значительном количестве. У риккетсий, дрожжей, микобактерий, грибов липидов содержится до 40%. У микробов других групп содержание липидов по сравнению с содержанием белков невелико — не более 3–7%. Бактериальные липиды состоят из свободных жирных кислот (26–28%), нейтральных жиров, восков и фосфолипидов. Особого внимания заслуживают фосфолипиды — сложные эфиры высших спиртов и кислот, содержащие азот и фосфор. Они входят в состав токсической фракции ряда микробов.

Химический состав спирохет, актиномицетов, микоплазм, риккетсий, микроскопических грибов в основном сходен с таковыми у бактерий.

## Ферменты

Ферменты — это биологические катализаторы белковой природы. Ферменты, как белки могут быть простыми и сложными. Питание и дыхание в микробной клетке происходит с участием ферментов, влияющих на скорость химических реакций, из которых складывается метаболизм микроорганизмов.

Микроорганизмы способны синтезировать огромное количество самых разнообразных ферментов. В микробных клетках имеются конститутивные и адаптивные

ферменты, появляющиеся в результате приспособления к новым субстратам. Конститутивные ферменты, в отличие от адаптивных, носят ярко выраженный наследственный характер. Возникновение новых ферментов в микробной клетке способствует активному использованию разнообразных органических субстратов.

Принято различать экзо- и эндоферменты.

**Экзоферменты** не связаны со структурой протоплазмы, активно выделяются в окружающую среду и на субстрат при жизни микробной клетки (гидролитические ферменты), растворимы в питательной среде и проходят через бактериальные фильтры. Эти ферменты имеют большое значение в процессе питания: именно они расщепляют сложные высокомолекулярные вещества (белки, крахмал, клетчатку и др.) до простых молекул, т. е. подготавливают питательные вещества к проникновению и усвоению их микробной клеткой.

**Эндоферменты** прочно связаны с телом бактериальной клетки и действуют только внутри клетки, осуществляя дальнейшее разложение поступивших питательных веществ и превращение их в составные компоненты клетки. К таким ферментам можно отнести, например, дегидрогеназы, оксидазы.

В настоящее время насчитывают более 2 тыс. ферментов. Их разделяют на шесть классов:

1) *оксидоредуктазы* — ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции;

2) *трансферазы* — ферменты, катализирующие перенос отдельных радикалов, частей или целых атомных группировок (не водорода) от одних соединений к другим;

3) *гидролазы* — ферменты, катализирующие реакции гидролиза (расщепления) белков, жиров и углеводов с участием воды;

4) *лиазы* — ферменты, катализирующие отщепление от субстрата определенных химических групп с образованием двойных связей или присоединение отдельных групп или радикалов с двойными связями;

5) *изомеразы* — ферменты, осуществляющие превращение органических соединений в изомеры;

6) *лигазы (синтетазы)* — ферменты, катализирующие процессы синтеза связей за счет энергии распада АТФ.

## 2.2. МЕТАБОЛИЗМ

Все реакции жизнеобеспечения, происходящие в микробной клетке и катализируемые ферментами, составляют обмен веществ, или *метаболизм*.

В процессе метаболизма микроорганизмов непрерывно осуществляются два противоположных и вместе с тем единых процесса: *анаболизм* и *катаболизм*, т. е. конструктивный и энергетический обмен. В первом случае обмен веществ протекает с поглощением свободной энергии при расходовании сравнительно небольшого объема питательного материала, во втором — идет процесс выделения свободной энергии, на что расходуются огромная масса питательного субстрата.

По типу питания все живые существа делятся на две группы: *голозойные* и *голофитные*. Голозойный тип питания характерен для животных, которые заглатывают корм, а голофитный — для микроорганизмов, которые не имеют органов пищеварения и поглощают питательные вещества всей поверхностью тела. Микробы выделяют на субстрат экзоферменты, которые осуществляют внеклеточное переваривание крупных молекул питательного субстрата до молекул, способных проходить внутрь через поры в клеточной стенке бактерий.

Различают несколько механизмов питания микробных клеток. Питательные вещества могут поступать из внешней среды в микробную клетку через клеточную стенку, слизистые слои и цитоплазматическую мембрану. Через эти же структуры выделяются и продукты обмена, т. е. ненужные и вредные для микроорганизмов вещества. В основе механизма такого питания лежит осмотическое явление, основанное на разности концент-

рации питательных веществ в теле микроба и питательном растворе. Таким образом, вода и растворенные в ней питательные вещества поступают в микробную клетку. В результате биосинтеза в ней накапливается пластический материал коллоидной структуры (белки, углеводы и другие вещества), обуславливающий рост и размножение микроорганизма.

Проникновение питательных веществ в клетку может осуществляться с помощью диффузии и стереохимического специфического переноса питательных веществ. Каждый из этих переносов может протекать как активно, так и пассивно. При пассивной диффузии питательные вещества проникают с током жидкости в клетку и только тогда, когда поступающее вещество способно растворяться в клеточной стенке бактериальной клетки. При активной диффузии наблюдается проникновение питательных веществ в бактериальную клетку нерастворенными в клеточной стенке.

При стереохимическом переносе питательных веществ (из внешней среды в клетку) роль переносчика выполняет пермеаза — белковый компонент. В этот период питательные вещества среды активно транспортируются в клетку, осуществляя конструктивный и энергетический обмены.

В норме у бактериальных клеток коллоиды цитоплазмы благодаря постоянному притоку к клетке воды всегда находятся в набухшем состоянии, в результате чего цитоплазма бывает плотно прижата к оболочке. Если бактерии поместить в гипертонический 15–20% -ный раствор хлорида натрия или сахара, то наступает резкое обезвоживание бактериальной клетки и протоплазматическое содержимое ее отходит от оболочки — такое явление носит название *плазмолиза*. К плазмолизу особенно устойчивы сенная палочка, стафилококки, сарцины; легко подвергаются плазмолизу бактерии из группы эшерихий, пастерелл, сибиреязвенные палочки, холерный вибрион и др. На явлениях плазмолиза основаны такие методы консервирования, как соленье овощей и приготовление варения и т. д.

Противоположный плазмолизу процесс — *плазмоплиз* — происходит, если бактерии поместить в гипотонический раствор хлорида натрия или в дистиллированную воду. Вода проникает в бактериальную клетку, цитоплазматическое вещество ее разбухает и клетка приобретает форму шара. Плазмоплиз, как и плазмолиз, влечет за собой гибель бактериальной клетки.

### 2.3. ТИПЫ ПИТАНИЯ МИКРОБОВ

Различают углеродное и азотистое питание микроорганизмов. По типу углеродного питания микробы принято делить на аутотрофы и гетеротрофы.

*Аутотрофы* (от греч. *autos* — сам, *trophe* — пища) — микроорганизмы, способные воспринимать углерод из угольной кислоты ( $\text{CO}_2$ ) воздуха. К ним относятся нитрифицирующие бактерии, железобактерии, серобактерии и др. Аутотрофы превращают воспринятую углекислоту в сложные органические соединения путем хемосинтеза, т. е. путем окисления химических соединений (аммиак, нитриты, сероводород и др.). Следовательно, они сами обладают способностью создавать органические вещества из неорганических, таких как угольная кислота, аммиак, нитриты, сероводород и др. Поскольку аутотрофные микробы не нуждаются в органических соединениях углерода, входящих в состав клеток животных и человека, среди них нет болезнетворных. Однако среди аутотрофов встречаются микробы, обладающие способностью усваивать углерод из ( $\text{CO}_2$ ) воздуха и из органических соединений.

*Гетеротрофы* (от греч. *heteros* — другой) в противоположность аутотрофным микробам получают углерод главным образом из готовых органических соединений. К гетеротрофам относятся возбудители всех видов брожений, гнилостные микробы, а также все болезнетворные микроорганизмы: возбудители туберкулеза, бруцеллеза, сальмонеллеза, патогенный кокки и ряд других возбудителей.

Гетеротрофы включают в себя две подгруппы: метатрофные и паратрофные микроорганизмы. *Метатрофы*, или сапрофиты, живут за счет использования мертвых органических субстратов. Сапрофиты (*sapros* — гнилой, *phyton* — растение) — гниlostные микробы. *Паратрофы* (от *греч.* *parasitos* — нахлебник) — паразиты, живущие на поверхности или внутри организма хозяина и питающиеся за его счет.

В качестве источника углерода гетеротрофы чаще всего используют углеводы, спирты, различные органические кислоты. Наиболее полноценными источниками углерода для питания микробов являются сахара (особенно гексозы), многоатомные спирты (глицерин, манит, сорбит и др.), а также карбоновые кислоты (например, глюконовая) и оксикислоты (молочная, яблочная и др.). Все эти источники углерода обычно включают в состав искусственных питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Основным источником азотного питания у автотрофов являются неорганические соединения азота, т. е. соли азота, у гетеротрофных микроорганизмов — аминокислоты, которые они используют из белков животного организма, если в нем паразитируют, или получают их готовыми из питательных сред.

В качестве универсального источника азота и углерода в питательных средах для патогенных микробов в лабораторной практике применяют пептоны. Необходимые для их жизни минеральные соли присутствуют в питательной среде. Микроэлементы — бор, цинк, марганец, кобальт и другие — встречаются в бактериях в ничтожных количествах и служат стимуляторами роста микробов.

## 2.4. ДЫХАНИЕ

Дыхание микробов — это биологический процесс, сопровождающийся окислением или восстановлением различных, преимущественно органических соединений с последующим выделением энергии в виде аденозин-

трифосфорной кислоты (АТФ), необходимой микробам для совершения физиологических процессов.

Процесс, в котором атомы или молекулы теряют электроны, называется *окислением*, а обратный процесс — присоединение электронов — *восстановлением*.

Перенос электрона всегда сопровождается высвобождением энергии, которая немедленно утилизируется клеткой с помощью аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинтрифосфата (АТФ). Здесь она накапливается и расходуется по мере надобности микробной клетки на ее нужды.

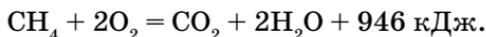
В настоящее время установлено, что биологическое окисление протекает путем дегидрирования, т. е. отщепления водорода от окисляемого соединения с последующим присоединением его к активному кислороду или же к другому акцептору, если окисление идет в анаэробных (бескислородных) условиях.

Совокупность окислительно-восстановительных ферментных реакций, осуществляющих последовательный перенос водорода с окисляемого продукта на кислород, называется тканевым дыханием и представляет собой дыхательную цепь.

### Типы биологического окисления

С биологической точки зрения окисление биологического субстрата микроорганизмами может быть достигнуто по типу прямого окисления или дегидрогенирования.

*Прямое окисление* осуществляется с помощью оксидаз путем непосредственного окисления вещества кислородом воздуха. Прямое окисление регистрируется у большинства сапрофитных микроорганизмов. Например, *Bact. metanicum*, окисляя метан, получает энергию по следующей схеме:



У некоторых микробов, поглощающих кислород, реакции окисления неполные, т. е. не доходят до получения конечного продукта — углекислоты. Примером такого неполного окислительного процесса служит ды-

хание уксуснокислых бактерий, у которых конечным продуктом окисления этилового спирта является не углекислота, а уксусная кислота.

*Непрямое окисление* путем дегидрогенирования сопровождается одновременным переносом двух электронов, причем от субстрата отщепляются два протона ( $H^+$ ). При ферментативном отщеплении водорода от субстрата при помощи дегидрогеназ освобождаются два электрона (энергия), подобно образованию ацетальдегида из этилового спирта:



*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.

*Анаэробное дегидрогенирование* осуществляется при отсутствии молекулярного кислорода. Акцепторами водорода в данном случае являются другие неорганические элементы, например соли азотной, серной кислот, углекислоты, которые превращаются при этом в наиболее 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. При анаэробном дыхании выход энергии только на 10% ниже, чем при аэробном дыхании.

## 2.5. РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Термин «рост» означает увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий в результате синтеза клеточного материала (например, белка, РНК, ДНК). Достигнув определенных размеров

и физиологической зрелости, клетка прекращает рост и начинает размножаться.

Под размножением микробов подразумевают способность их к самовоспроизведению, увеличению количества особей на единицу объема. Иначе можно сказать: размножение — это повышение числа особей микробной популяции.

Бактерии размножаются преимущественно простым поперечным делением (вегетативное размножение), которое происходит в различных плоскостях, с образованием многообразных сочетаний клеток (кисть винограда — стафилококки, цепочки — стрептококки, соединения парами — диплококки, тюки и пакеты — сарцины и др.).

В процессе деления бактерий важным условием является репликация (удвоение) ДНК, которая осуществляется ферментами ДНК-полимеразой. Репликация ДНК и деление клеток зависят от состава среды, температуры, влажности и происходят с определенной скоростью, присущей каждому виду микроба. Например, скорость деления кишечной палочки и стафилококка составляет 20–30 мин, а возбудителя туберкулеза 18–20 ч.

Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции принято показывать графически в виде кривой, которая отражает зависимость логарифма живых клеток во времени. Типичная кривая роста бактериальной культуры в пробирке в течение суток имеет S-образную форму и позволяет различать несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

1. Исходная (латентная, или фаза покоя). Представляет собой период от момента посева бактерий в питательную среду до начала роста, когда они приспособляются к новым условиям питательной среды (1–2 ч).

2. Фаза задержки размножения. В этот период бактериальные клетки получают информацию из окружающей среды, интенсивно растут, но размножаются

слабо. Продолжительность фазы зависит от вида и возраста посеянного микроба, от температуры, полноценности и рН питательной среды (продолжительность около 2 ч).

3. Фаза логарифмического размножения. В этот период скорость размножения клеток и увеличения численности бактериальной популяции максимальна, число клеток увеличивается в геометрической прогрессии (продолжительность около 5–6 ч). В промышленной микробиологии для получения большой микробной массы продолжительность фазы логарифмического размножения удлиняют добавлением свежей питательной среды.

4. Стационарная фаза максимума. Число вновь появляющихся клеток почти равно числу отмерших, т. е. наступает равновесие между погибшими клетками и вновь образующимися (2–4 ч).

5. Фаза ускорения гибели. Число погибших клеток преобладает над числом вновь нарождающихся (6–8 ч). Эта фаза характеризуется гибелью клеток в условиях истощения питательной среды и накопления в ней продуктов метаболизма микроорганизмов.

6. Фаза уменьшения скорости отмирания. Остающиеся в живых клетки переходят в состояние анабиоза (происходит спорообразование у бацилл).

В лабораторной практике обычно используются микробные культуры, выращенные на искусственных питательных средах в течение 18–24 ч при 37°C. Для определения вида исследуемого микроба у суточной культуры изучают морфологические, культуральные и ферментативные свойства.

Знание физиологии микроорганизмов, скорость их размножения имеют большое значение в промышленной микробиологии (биотехнологии) при крупнотоннажном производстве: получении антибиотиков, органических кислот, микробных ферментов, биопрепаратов для медицинских, ветеринарных и сельскохозяйственных целей.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите органогены, входящие в состав микробной клетки.
2. Какие минеральные вещества входят в состав микроорганизмов?
3. Что представляют собой ферменты микробных клеток и какое участие они принимают в жизнедеятельности клеток?
4. Назовите гидролитические и окислительные ферменты.
5. Назовите типы питания микробов и раскройте их суть.
6. В чем состоит сущность классификации микробов по типу дыхания?

## ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

**П**од наследственностью понимают свойства живых организмов воспроизводить одни и те же или сходные морфологические и другие свойства в ряду поколений благодаря передаче генов от родителей потомкам. В настоящее время установлено, что материальной основой наследственности, определяющей генетические свойства всех организмов, в том числе микроорганизмов, является дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, называемая геномом. У РНК-содержащих вирусов генетическая информация записана в РНК.

Генетика — наука о наследственности и изменчивости организмов. Целью генетики является изучение и анализ законов передачи наследственных признаков от поколения к поколению, а также выяснение механизмов, обеспечивающих наследование на всех уровнях организации живых существ (особь, клетка).

Под наследственностью мы понимаем свойство живых организмов, воспроизводить одни и те же сходные морфологические свойства в ряду поколений благодаря передаче материальных задатков (генов) от родителей потомкам.

Основная генетическая структура прокариотной клетки — это хромосома, представляющая собой громадную молекулу ДНК в виде двойной спирали, замкнутой в кольцо. Она является носителем генетической информации и называется геномом. Молекула состоит из функционально неоднородных генетических детер-

минант — генов, которые располагаются линейно вдоль хромосомы бактерий, как и все прокариоты, гаплоидны, т. е. генетический материал у них представлен одним набором генов. Функциональная единица наследственности — ген. Все свойства организма однозначно определены его генами. Каждый ген может существовать в виде ряда структурных форм, или аллелей. Совокупность аллелей всех генов клетки составляет ее генотип. В генах записана информация относительно всех свойств, присущих клетке. Гены определяют особенности клеточных компонентов, их структуру и функцию.

### **3.1. НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Наследственность неразрывно связана с другими свойствами и изменчивостью, т. е. изменением специфических свойств под действием различных факторов.

**Изменение морфологических признаков.** Под влиянием физических, химических, биологических агентов у многих микроорганизмов наблюдается изменение формы и величины бактерий.

**Культуральные свойства.** Одной из форм культуральной изменчивости является феномен диссоциации, т. е. разъединение популяций бактерий и возникновение S- и R-форм колоний.

**Изменчивость ферментативных (биохимических) свойств.** Бактерии каждого вида имеют определенный набор ферментов, благодаря которым усваивают различные питательные вещества. Эти ферменты вырабатываются на определенных питательных субстратах и предопределены генотипом. В процессе жизнедеятельности бактерий обычно функционируют не все гены, ответственные за синтез соответствующих ферментов. В геноме бактерий всегда имеются запасные возможности, т. е. гены, определяющие выработку адаптивных ферментов.

**Изменчивость биологических свойств.** Луи Пастер в 1880 г. впервые показал, что патогенная культура возбудителя холеры кур после длительного выдерживания в условиях термостата потеряла патогенные свойства, но сохранила иммуногенные свойства, что в дальнейшем было использовано при приготовлении вакцины против холеры кур.

**Материальные основы наследственности.** Основной генетической структурой прокариотной клетки является *хромосома*, представляющая собой громадную молекулу ДНК в виде двойной спирали, замкнутой в кольцо. Она является носителем генетической информации и называется геномом. Молекула состоит из функционально неоднородных генетических детерминант — *генов*, которые располагаются линейно вдоль хромосомы. Схема, отражающая расположение генов на хромосоме, называется генетической картой. Бактерии, как и все прокариоты, гаплоидны, т. е. генетический материал у них представлен одним набором генов. Функциональная единица наследственности — ген. Все свойства организма однозначно определяются его генами. Каждый ген может существовать в виде ряда структурных форм, или аллелей. Совокупность аллелей всех генов клетки составляет его генотип. В генах записана информация относительно всех свойств, присущих клетке. Гены определяют особенности клеточных компонентов, их структуру и функцию.

### 3.1.1. Формы изменчивости микроорганизмов

У бактерий различают фенотипическую, или модификационную (ненаследственную), генотипическую (наследственную) изменчивость.

**Фенотипическая изменчивость.** Проявление наследуемых морфологических признаков и физиологических процессов у индивидуума называется фенотипом (от *греч.* *phaino* — проявлять, показывать). Сходные по генотипу микроорганизмы могут существенно различаться по фенотипу, т. е. по способу проявления наслед-

ственных признаков. Фенотипические различия между микроорганизмами, одинаковыми по генотипу, называются *модификациями* (фенотипическими адаптациями).

**Генотипическая изменчивость.** Изменениям подвержен также и генотип. Генотипическая изменчивость играет большую роль в эволюции организмов: если бы клетки не обладали способностью к изменениям генотипа, то любое неблагоприятное изменение условий среды привело бы к вымиранию вида.

В основе генотипической изменчивости лежат мутации и рекомбинации. Они происходят в структуре ДНК — генетическом аппарате клетки — и проявляются в стабильности изменений каких-либо свойств.

### 3.1.2. Мутации

Под мутацией (от *лат.* mutatio — изменение) понимают внезапные, скачкообразные изменения наследственных свойств. Основу этого явления составляют качественные или количественные изменения последовательности нуклеотидов в ДНК, которые могут возникать при жизнедеятельности бактерий под влиянием эндогенных факторов или при действии химических или физических мутагенов. Бактерии с измененными признаками называют мутантами. Различают спонтанные и индуцированные мутации. Спонтанные мутации возникают под влиянием неизвестных причин, индуцированные — в результате целенаправленной обработки микробной массы специальными химическими веществами, физическими и другими факторами, называемыми мутагенами.

**Генетические рекомбинации.** Кроме мутаций, ведущих к изменению генотипа, у бактерий известны три способа передачи генетической информации от донорской клетки с одним генотипом реципиенту с другим генотипом. Эта передача осуществляется путем трансформации, трансдукции и конъюгации. В результате рекомбинации образуются микробы, обладающие свойством обоих родителей (рекомбинанты).

*Трансформация* (от лат. *transformatio* — превращение) — это процесс переноса участка генетического материала, поглощенного из окружающей среды, содержащего одну пару нуклеотидов, от микроба-*донора* к микробу-*реципиенту*. Путем трансформации могут быть перенесены различные признаки: устойчивость к антибиотикам, синтез нужных ферментов, *вирулентность* и другие свойства.

*Трансдукция* (от лат. *transductio* — перемещение), при которой генетический материал от микроба-донора к реципиенту переносит трансдуцирующий (умеренный) бактериофаг, не вызывающий разрушение микроба. Один и тот же фаг может трансдуцировать различные признаки: ферментативную активность, устойчивость к антибиотикам, подвижность и др.

*Конъюгация* (от лат. *conjugatio* — соединение) некоторая аналогия полового процесса. Две конъюгирующие клетки соединяются через конъюгационный мостик, образованный половой ворсинкой F-пили, через которую переносится генетический материал. При этом генетический материал клетки-донора переходит в клетку-реципиента.

Все три процесса генетической рекомбинации у бактерий различны по форме, но одинаковы по существу — в результате каждого процесса происходит перенос фрагмента ДНК от одной клетки к другой. При трансформации в бактерию-реципиент входит свободная ДНК; при трансдукции фаг захватывает участок хромосомы бактерии-донора и передает реципиенту, в который он внедрился; в процессе конъюгации происходит перенос фрагмента ДНК через цитоплазматический мостик между бактериями.

Благодаря знанию механизмов изменчивости микробов исследователи научились перемещать генетический материал как в пределах одного генома, так и между разными геномами. Таким образом возникло новое направление молекулярной биологии — генная инженерия (1972), которая занимается конструированием, выделением и пересадкой определенных генов из одних

микробных клеток в другие. В результате микробы приобретают новые свойства.

Методом генетической инженерии можно решить следующие задачи:

- генетически изменить микроорганизмы для увеличения количества, вырабатываемого данным организмом необходимого продукта (антибиотиков, аминокислот, ферментов и др.);
- осуществить перенос соответствующих генов млекопитающих и человека в микроорганизмы для получения специфических белков (инсулина, гормонов, интерферона, ферментов и др.).

За последние десятилетия бурно развивается новая отрасль промышленной микробиологии — биотехнология, которая использует методы генетической и клеточной инженерии для получения биологически активных веществ с заданными свойствами (антибиотики, витамины, вакцины, диагностикумы), которые находят широкое применение в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и промышленности.

Методы генной инженерии нашли широкое практическое применение при создании штаммов, продуцирующих «терапевтические пептиды» (инсулин, интерферон), ферменты и аминокислоты. Удалось перенести ген антивирусного белка человека — интерферона — в сенную палочку (*Bac. subtilis*) и в клетки дрожжей. Проводятся исследования возможности переноса в бактерии гена из клеток коров, детерминирующих синтез гормона, способствующего образованию молока, что позволит применять его в молочном животноводстве в качестве стимулятора, повышающего надои.

В последние годы в биотехнологии используют клетки, которые не живут в природе в свободном виде, но образуют вещества, необходимые для диагностики и лечения болезней, — это культура клеток из органов млекопитающих, а также используют гибридомы — клетки, полученные при слиянии двух линий клеток млекопи-

тающих. Гибридомы получают путем слияния нормальных клеток лимфоцитов и клеток миеломы, полученные клетки применяют для получения моноклональных антител. Методы культивирования гибридом почти аналогичны методам культивирования микроорганизмов в условиях *in vitro* (в пробирке).

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы цели и задачи генетики микроорганизмов?
2. Что вы понимаете под термином «ген»?
3. Что означает термин «фенотипическая изменчивость»?
4. Что означает термин «генотипическая изменчивость»?
5. Что вы понимаете под термином «мутация»?
6. Какие три процесса относятся к генетическим рекомбинациям?

## **ПРЕВРАЩЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА, УГЛЕРОДА, ФОСФОРА, СЕРЫ, ЖЕЛЕЗА И ДРУГИХ ЭЛЕМЕНТОВ**

**М**икроорганизмам принадлежит исключительно важная роль в круговороте веществ в природе. Наиболее отчетливо биогеохимическая деятельность микроорганизмов проявляется в реакциях разложения органических веществ, в окислении водорода, метана, серы, в восстановлении сульфатов и во многих других процессах, обеспечивающих круговорот биогенных элементов.

### **4.1. КРУГОВОРОТ АЗОТА**

Азот (N) — важнейший биогенный элемент, входящий в состав белковой молекулы каждого живого существа. Запасы газообразного азота в атмосфере огромны. Столб воздуха над гектаром почвы содержит до 80 тыс. т азота. Однако ни растениям, ни животным он

не доступен, так как растения могут использовать для питания азот минеральных соединений, а животные потребляют азот в форме органических соединений. Только специфическая группа микроорганизмов обладает способностью фиксировать и строить из него все разнообразие азотсодержащих органических соединений своей клетки.

Цикл превращений азота в природе с участием микроорганизмов состоит из четырех этапов: фиксации атмосферного азота, аммонификации, нитрификации и денитрификации.

#### 4.1.1. Фиксация атмосферного азота

Способностью фиксировать атмосферный азот и строить из него тело своей клетки обладают микроорганизмы, получившие название азотфиксирующих. В результате их жизнедеятельности происходит значительное повышение плодородия почвы.

Биологическая фиксация азота в природе осуществляется двумя группами микроорганизмов: *свободноживущими* (несимбиотическими) и микроорганизмами, существующими в сообществе с растениями (*симбиотическими или клубеньковыми*). К наиболее важным свободноживущим азотфиксаторам относятся *Azotobacter chroococcum*, *Clostridium pasteurianum*, *Pseudomonas fluorescens*. К активным азотфиксаторам относятся цианобактерии (сине-зеленые водоросли), обнаруживаемые во всех почвенно-климатических зонах.

*Azotobacter* — строгий аэроб, в свежей культуре представляет собой крупные палочки длиной от 4 до 6 мкм, подвижные, часто соединенные попарно, по Граму окрашиваются положительно. В старых культурах превалируют кокковые формы, окруженные общей капсулой. Азотобактерии в течение года на площади 1 га фиксируют от 20 до 50 кг газообразного азота, особенно интенсивно процесс фиксации происходит при хорошей аэрации почвы.

*Cl. pasteurianum* — полиморфные палочки 1,5–8 мкм длиной, 0,8–1,3 мкм шириной, подвижные, грамположительные, анаэробы, образуют споры, хорошо развиваются в почве при наличии аэробных бактерий. Микроорганизм широко распространен в природе. Рисовые поля обогащаются азотом в основном за счет этого микроба.

*P. fluorescens* — аэроб, подвижный, грамотрицательный, от 2 до 5 мкм длиной, 0,3–0,4 мкм шириной, широко представлен в почвах северной зоны.

К симбиотическим азотфиксаторам относятся бактерии рода *Rhizobium* (клубеньковые бактерии). Они подвижны, палочки 1,2–3 мкм длиной, 0,5–0,9 мкм шириной, грамотрицательные, спор не образуют. При старении бактерии теряют подвижность. Клубеньковые бактерии способны внедряться в корневые волоски бобовых растений и развиваться в них с образованием на корнях клубеньков, где и происходит фиксация азота. Таким образом между бактериями и растениями устанавливаются симбиотические отношения. Бактерии питаются органическими соединениями, синтезированными растениями, а растения получают из клубеньков связанные соединения азота. При достаточной аэрации почвы, влажности и температуре клубеньковые бактерии в течение года на 1 га могут зафиксировать до 200 кг атмосферного азота, что значительно повышает плодородие почвы.

В хозяйствах с целью повышения плодородия почвы используют азотобактерин и нитрагин, приготавливаемые в специальных лабораториях. Азотобактерин состоит из живой культуры азотобактера, выращенной на нейтральном торфе или садовой почве. Вместе с посевным материалом его вносят под не бобовые культуры (картофель, свекла). Выпускают две формы нитрагина: ризотрофин и ризобин. Ризотрофин представляет собой смесь клубеньковых бактерий со стерильным торфом. Ризобин (сухой нитрагин) представляет собой высушенную культуру клубеньковых тканей. Препараты вносят в почву под растительные культуры.

#### 4.1.2. Аммонификация белков

Значительные запасы органического азота сохраняются в растительных и животных тканях. Когда гибнут растения и животные, компоненты их тканей и тела подвергаются действию микроорганизмов и азотистые соединения разрушаются с образованием аммиака. Этот процесс называют аммонификацией, или минерализацией, азота. Процесс аммонификации может происходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях при участии разнообразных микроорганизмов: бактерий, бацилл, клостридий, актиномицетов, плесневых грибов.

Расщепление белковых веществ происходит за счет действия протеолитических ферментов, выделяемых гнилостными микроорганизмами. Глубина расщепления белковых веществ зависит от вида микробов и условий их жизнедеятельности. Аэробная гнилостная микрофлора совершает глубокое расщепление белков, конечными продуктами которого являются аммиак,  $\text{CO}_2$ , сульфаты и вода. При распаде белка в анаэробных условиях образуется аммиак,  $\text{CO}_2$ , органические кислоты, а также индол, скатол, обладающие неприятным запахом. Аммонификация остатков растений, трупов, других органических субстратов ведет к обогащению почвы азотистыми продуктами. Одновременно гнилостные микробы выполняют огромную санитарную роль, очищая почву и гидросферу от разлагающегося органического субстрата.

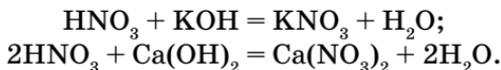
К аэробным аммонификаторам относятся широко распространенные в природе: *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*, *Bac. megaterium* — все они грамположительные, подвижные палочки, образующие споры. Из анаэробных аммонификаторов наиболее активны спорообразующие, грамположительные, подвижные палочки *Cl. putrificum*, *Cl. sporogenes*, их всегда можно обнаружить в кишечнике, навозе и почве.

### 4.1.3. Аммонификация мочевины

Подсчитано, что весь животный мир земного шара за сутки выделяет более 150 тыс. т мочевины. В моче содержится 47% азота, поэтому она считается одним из концентрированных азотистых удобрений. Мочевина непригодна для азотистого питания растений, и только после разложения ее микроорганизмами она становится усвояемой. Бактерии, разлагающие мочевины, называются уробактериями (*urea* — моча). Под действием фермента уреазы, вырабатываемого уробактериями, мочевина превращается в аммиак и углекислый газ. К уробактериям относят: *Bac. probatus* — крупная палочка, подвижная, грамположительная, образует споры; *Sporasarcina* — образует крупные шарообразные клетки, соединенные в пакеты, имеет жгутики.

### 4.1.4. Нитрификация

Это следующий за аммонификацией этап превращения азота микроорганизмами. Аммиак, образующийся в почве, навозе и воде при разложении органических веществ, довольно быстро окисляется сначала в азотистую, а затем в азотную кислоту. Протекает процесс нитрификации в две фазы. Первую фазу — окисление солей аммония до солей азотистой кислоты (нитритов) — осуществляют микроорганизмы родов *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*. Вторую фазу — окисление азотистой кислоты до солей азотной кислоты (нитраты) — осуществляют бактерии из родов *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*. Образовавшаяся азотная кислота в почве вступает в соединение со щелочами, в результате чего образуется селитра:



Селитра повышает плодородие почвы, растворяется в воде и хорошо усваивается растениями. Бактерии рода *Nitrosomonas* имеют форму палочек, подвижные, грам-

отрицательные, с одним жгутиком, широко распространены в почве. Род *Nitrococystis* способен образовывать зооглеи (скопление кокков, окруженных общей капсулой). Бактерии рода *Nitrospira* имеют правильную спиральную форму. Род *Nitrobacter* — полиморфные мелкие палочки, неподвижные, грамотрицательные.

#### 4.1.5. Денитрификация

Это процесс, обратный нитрификации. Различают прямую и косвенную денитрификацию. Прямая денитрификация вызывается бактериями, широко распространенными в почве, навозе и водоемах. Среди них наибольшее значение имеют: *Thiobacillus denitrificans* — палочка, не образующая спор, факультативный анаэроб; *Pseudomonas fluorescens* — подвижная палочка, грамотрицательная, образует зеленоватый пигмент; *Ps. stutzeri* — палочка, образующая цепочки; *Paracoccus denitrificans* — имеет форму кокков. Денитрифицирующие бактерии восстанавливают нитраты до молекулярного азота. В почве развиваются без доступа воздуха и в щелочной среде.

Косвенная денитрификация осуществляется чисто химическим путем при взаимодействии азотистой кислоты с аминными соединениями. Роль микробов в этих процессах косвенная и сводится к образованию нитритов, главным образом из нитратов. Косвенной денитрификации способствуют самые разнообразные виды микробов, которые не только восстанавливают нитраты, но и разлагают белковые вещества с образованием аминокислот.

## 4.2. КРУГОВОРОТ УГЛЕРОДА

Углерод входит в состав органических соединений, которые являются продуктами фотосинтеза. В воздухе его содержится немногим более 0,03% (по объему). Такая концентрация углекислоты в атмосфере поддер-

живается относительно постоянной в результате динамического равновесия между фотосинтезом и минерализацией. О значимости круговорота углерода в природе свидетельствует расчет: весь углерод атмосферы в случае отсутствия пополнения был бы полностью исчерпан при современной скорости фотосинтеза менее чем за 20 лет. Велика роль микроорганизмов в поддержании равновесия и круговорота  $\text{CO}_2$  на нашей планете. При минерализации органических веществ они образуют почти столько же углерода, сколько используется растениями в процессе фотосинтеза.

Роль микробов в разложении клетчатки. В состав клетчатки (целлюлозы) входит более 50% всего органического углерода биосферы. Клетчатка — наиболее распространенный полисахарид растительного мира; высшие растения на 15–50% состоят из целлюлозы. После гибели растений она подвергается разложению, в результате чего освобождается углерод. Разложение клетчатки происходит в аэробных и анаэробных условиях. В природе распад клетчатки происходит повседневно в почве, водоемах, навозе, пищеварительном тракте травоядных благодаря ферментам, которые выделяют различные микроорганизмы.

*Аэробное разложение* (брожение) клетчатки наиболее интенсивно происходит под влиянием следующих трех широко распространенных в природе родов микроорганизмов: *Cytophaga* — подвижные с заостренными концами палочки; *Cetacacula* — короткие с заостренными концами палочки; *Seivirio* — длинные палочки, слегка изогнутые. Кроме того, в аэробных условиях клетчатку разлагают актиномицеты и грибы родов *Aspergillus*, *Penicillum* и др.

*Анаэробное брожение* клетчатки происходит в два этапа. На первом этапе клетчатка осаживается, а затем сахар разлагается в зависимости от типа брожения на спирты, молочную, масляную кислоты, углекислоту, водород, метан и др. Известно, что в природе име-

ются два типа анаэробного брожения клетчатки — водородное и метановое, которые осуществляются двумя анаэробными бактериями-целлюлозоразрушителями: *Cl. omelianskii* и *Cl. cellobioparum*. Оба микроба представляют собой крупные грамположительные палочки, подвижные, образуют споры, обитают в почве и навозе. Водородное и метановое брожение клетчатки происходит также в преджелудках крупного рогатого скота при поедании большого количества зеленой массы бобовых, особенно влажной от дождя или утренней росы, что обуславливает развитие острой тимпании рубца.

Следует особо отметить, что в рубце жвачных животных имеются специфические облигатные целлюлозоразлагающие бактерии. Они разлагают целлюлозу кормов до глюкозы, которая затем сбраживается с образованием органических кислот (уксусной, пропионовой, масляной, молочной, муравьиной, янтарной и др.), спиртов и газов ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ ). Разложение целлюлозы в рубце животных осуществляют кокковидные и палочковидные бактерии: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrovibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter parvum*. Указанные бактерии имеют большое значение в питании жвачных животных.

#### 4.2.1. Разложение пектиновых веществ

Разрушение погибших растений происходит при активном участии микроорганизмов, разрушающих пектиновые межклеточные вещества, связывающие растительные клетки. Пектиновое брожение обуславливается микроорганизмами, которые относятся к родам *Bacillus* (*Bac. macerans* и *Bac. polymyxa*) и *Cl. ostromitium* (*Cl. pectinovorum*, *Cl. pectinolyticum* и др). Пектиновое брожение наблюдается при мочке льна, конопли, джута и др. Целлюлозные волокна этих растений склеены с окружающими их тканями пектином.

### 4.2.2. Спиртовое брожение

При спиртовом брожении микроорганизмы расщепляют углеводы (сахара) с образованием этилового спирта как основного продукта и углекислоты с выделением энергии:



К возбудителям спиртового брожения относятся некоторые дрожжи, главным образом из рода *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. ellipsoides*, *S. vini* и др.). В пищевой промышленности используются изученные, отобранные в результате многолетней селекционной работы, так называемые культурные дрожжи, в отличие от «диких». По структуре накапливаемой дрожжевой массы их делят на пылевидные и хлопьевидные. У пылевидных дрожжей клетки находятся во взвешенном состоянии, а у хлопьевидных — они склеиваются, образуют хлопья и оседают на дно. Пылевидные дрожжи применяют при производстве спирта, хлопьевидные — в виноделии и пивоварении. Дрожжи лучше развиваются в кислой среде (рН 4–6), они устойчивы к высоким концентрациям сахара (до 70%) и выдерживают до 15% спирта в растворе. В зависимости от того, в каких условиях происходит процесс (аэробный или анаэробный), дрожжи делят на дрожжи верхового и низового брожения. Дрожжи верхового брожения (*S. cerevisiae*) находятся в верхних слоях суслу, куда они поднимаются образующейся углекислотой и пеной. Брожение идет с незначительным повышением температуры (20–28°C). Через 5–7 дней верховое брожение заканчивается, дрожжи за 1–2 дня до окончания брожения образуют хлопья и оседают на дно бродительных емкостей. Дрожжи низового брожения (*S. vini*) развиваются в анаэробных условиях и при более низкой температуре (6–12°C), поэтому процесс протекает медленно (8–10 дней). В конце брожения дрожжи также оседают на дно и образуют хлопьевидный осадок. Значение спиртового брожения очень велико. Этот процесс лежит в основе виноделия, пивоварения, производ-

ства спирта, хлебопечения. Дрожжи используют и для приготовления кормового белка.

### 4.2.3. Молочнокислое брожение

При молочнокислом брожении происходит распад углеводов, а также многоатомных спиртов и белков до молочной кислоты. В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании глюкозы — только молочная кислота или также и другие органические продукты и  $\text{CO}_2$ , — молочнокислые бактерии принято подразделять на гомоферментативные и гетероферментативные. Это деление отражает различия в путях катаболизма углеводов.

Гомоферментативное молочнокислое брожение. Гомоферментативное молочнокислое брожение характеризуется тем, что в процессе сбраживания 98% углеводов превращается в молочную кислоту. Гомоферментативные молочнокислые бактерии включают морфологически разные группы — кокки (роды *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*) и палочковидные формы (род *Lactobacillus*).

Кокковые формы включены в род *Streptococcus*, к которому отнесены виды *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*, *Str. thermophilus*.

*Str. lactis* (молочнокислый стрептококк) — клетки овальной формы, расположенные в виде цепочек. Он неподвижный, грамположительный. Кроме моносахаридов, сбраживает лактозу и мальтозу. Оптимальная температура для развития 30–35°C. *Str. cremoris* (сливочный стрептококк) — клетки овальной формы, расположенные в виде длинных цепочек. Образует летучие кислоты. Используют при производстве кисломолочных продуктов. *Str. diacetylactis* образует в молочных продуктах, кроме летучих кислот, еще и ароматические соединения, обладает способностью сбраживать лимонную кислоту. *Str. thermophilus*, как указывает название, может развиваться при повышенной температуре (около 45°C).

Палочковидные молочнокислые бактерии включены в род *Lactobacillus*, который характеризуется значительным разнообразием форм — от короткой палочки до длинной нитевидной. Располагаются в виде единичных клеток, парами или цепочками. Бактерии этого рода разделены на две группы. Первая представлена термофильными микроорганизмами, которые хорошо растут при 44°C, слабо развиваются при 20°C и не растут при температуре ниже 10°C. К ним относятся виды *Lact. delbrueckii*, *Lact. lactis*, *Lact. bulgaricus*, *Lact. acidophilus* и др. Представители второй группы — *Lact. casei* и *Lact. plantarum* — при размножении в молоке образуют короткие цепочки. Это группа менее активных мезофильных молочнокислых палочек, хорошо развивается при температуре 15–38°C, оптимум — при 30°C.

Гетероферментативное молочнокислое брожение. В процессе гетероферментативного молочнокислого брожения, кроме лактата, образуются значительные количества уксусной кислоты, этилового спирта, углекислого газа и иные побочные продукты (диацетил, ацетоин), на что используются до 50% сбраживаемых гексоз. Его осуществляют представители родов *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.

Бактерии рода *Leuconostoc* имеют вид округлых клеток, располагающихся одиночно, парами или короткими цепочками; делятся в двух плоскостях, поэтому иногда образуют тетрады. Факультативные анаэробы, неподвижные, грамположительные, оптимум температуры 20–30°C. Род включает виды *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. citrovorum*.

Род *Lactobacillus* включает виды *L. fermentum*, *L. brevis*, которые обычно встречаются на растениях, обнаруживаются в хлебных заквасках. Это небольшие грамположительные палочки, температурный максимум около 45°C. Род *Lactobacillus* по морфологии характеризуется большим разнообразием — от коротких коккообразных до нитевидных палочек длиной от 0,7–1,1 до 3–8 мкм, расположенных единично или собранных в цепочки.

К роду *Bifidobacterium* отнесены полиморфные, неподвижные, грамположительные бактерии, имеющие вид прямых, булавовидных и разветвленных, иногда в виде римской цифры «V», расположенных одиночно или цепочками, строго анаэробных, температурный оптимум для них 36–38°C. Бифидобактерии являются постоянными обитателями кишечника человека и животных, типичный представитель рода — *B. bifidum*.

Антагонизм молочнокислых бактерий по отношению к условно патогенным и патогенным микробам обуславливается антимикробным действием молочной кислоты, которую они продуцируют, а также образованием антибиотических веществ, например *Str. lactis* — синтезирует лизин, *Str. cremoris* — диплококкин, *L. acidophilus* — ацидофилин и лактоцидин, *L. plantarum* — лактолин, *L. brevis* — бревин и др.

Молочнокислые бактерии размножаются делением перегородкой. Если клетки делятся в одной плоскости, это приводит к образованию цепочек; когда же деление идет в двух плоскостях, образуются так называемые тетрады, характерные для молочнокислых бактерий рода *Pediococcus*. Клетки рода *Lactococcus* делятся в одной плоскости, в результате чего образуются пары и цепочки кокков.

#### 4.2.4. Пропионовокислое брожение

Пропионовокислое брожение осуществляется бактериями рода *Propionibacterium*. Они представляют собой неподвижные грамположительные палочки, полиморфные, образующие булавовидные формы; располагаются одиночно, парами, цепочками; спор не образуют; анаэробы, оптимальная температура роста 30–37°C, pH 7. Эти бактерии встречаются на растениях, в почве, в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Источниками энергии для них служат углеводы, органические кислоты, спирты и другие вещества. Пропионовокислые бактерии способны сбразивать молочную кислоту, образовавшуюся в результате брожения, вызванного молочнокислыми бактериями.

Конечные продукты пропионовокислого брожения — пропионовая и уксусная кислоты,  $\text{CO}_2$  и вода.

Пропионовокислые бактерии используют для получения витамина  $\text{B}_{12}$ , который они образуют в значительных количествах.

#### 4.2.5. Маслянокислое брожение

Маслянокислое брожение обуславливают некоторые бактерии из рода *Clostridium*. Типичный представитель — *Cl. butyricum*. Это крупная палочка длиной от 2 до 10 мкм, подвижна, грамположительна, образует споры, анаэроб. В качестве источника углерода используют моно- и дисахариды, некоторые полисахариды (декстрин, крахмал), молочную, пировиноградную кислоты, маннит, глицерин и другие соединения. Источником азота служат разнообразные вещества — аминокислоты, аммиачные соединения и др.

Маслянокислое брожение начинается с разложения сахаров в пировиноградную кислоту. Конечные продукты из пировиноградной кислоты образуются в результате цепи реакций, катализируемых несколькими ферментными системами.

Маслянокислые бактерии являются виновниками порчи силоса, растительных масел и жиров животного происхождения, также семян сои и подсолнечника. Например, при размножении в силосуемых (заквашиваемых) растениях белковая часть корма разлагается, образуемая масляная кислота ухудшает качество корма, происходит его прогоркание. Животные плохо поедают такой корм.

#### 4.2.6. Уксуснокислое брожение

Микробиологический процесс, при котором этиловый спирт окисляется до уксусной кислоты под влиянием уксуснокислых бактерий. Бактериальная природа этого процесса была установлена в 1868 г. Л. Пастером.

Уксуснокислые бактерии — короткие палочки, подвижные и неподвижные, грамотрицательные, не образующие спор, строгие аэробы. Все виды (25) уксусных бактерий объединены в род *Acetobacter*. Типичными представителями являются *A. aceti*, *A. pasteurianum* и др. *A. aceti* — короткая палочка, неподвижная, грамотрицательная, располагается цепочками. На поверхности питательного субстрата (пива, не крепленых спиртом сухих вин) образует различной плотности пленку. Оптимальная температура для промышленного культивирования 30–34°C. Уксуснокислые бактерии используют для производства пищевого уксуса из вина и спирта в промышленных условиях.

### **4.3. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ФОСФОРА, ЖЕЛЕЗА И СЕРЫ**

#### **4.3.1. Фосфор**

Имеет большое значение в жизнедеятельности организма. Без него не могут синтезироваться белки, он входит в состав ядерного вещества и многих ферментов. В почве содержится в основном в органической, не усвояемой растением форме и в виде трудноусвояемых минеральных соединений. Органические соединения фосфора попадают в почву вместе с растительными остатками, трупами животных и отмершими микроорганизмами. Они представлены нуклеопротеидами, нуклеиновыми кислотами и др. Роль микробов в превращении фосфора сводится к двум процессам: минерализации фосфора, входящего в состав органических веществ, и превращению фосфорнокислых солей из слаборастворимых в хорошо растворимые, доступные для растений.

Органические и неорганические соединения фосфора разлагаются бактериями родов *Pseudomonas*, *Bacillus* (*Bac. megaterium*), грибами из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* и др.

### 4.3.2. Железо

Широко распространено в природе, встречается в виде органических и минеральных соединений, входит в состав животных и растительных организмов. Содержится в гемоглобине крови и дыхательных ферментах-цитохромах. При недостатке железа у животных развивается анемия, растения теряют зеленую окраску. Железо бывает в форме нерастворимого окисного  $Fe^{3+}$  и растворимого закисного  $Fe^{+4}$ . Перевод органического железа из окисного в закисное и наоборот осуществляется в основном микроорганизмами, получившими название железобактерий. К ним относятся нитчатые бактерии (*Leptothrix*, *Crenothrix*), бактерии рода *Gallionella* и др.

Железобактерии — аэробы, встречаются в болотах, прудах, железистых источниках. В таких водоемах они окисляют закиси железа. В процессе деятельности железобактерий образуется окись железа. Скопление отмерших железобактерий (гидрат окиси железа) образует на дне стоящих водоемов залежи болотной руды.

### 4.3.3. Сера

Содержится в организме животных и растений, входит в состав серосодержащих аминокислот (цистеин, цистин, метионин), витаминов группы В (биотин, тиамин), много ее в волосах и перьях. Органические соединения серы в почве представлены останками животных и растений. При разложении в почве органических серосодержащих веществ, а также при восстановлении солей серной, сернистой и серноватистой кислот образуется сероводород, ядовитый для растений и животных. Сероводород окисляется серобактериями в безвредные, доступные для растений соединения. Серобактерии представлены несколькими различными группами: нитчатые, тионовые и фотосинтезирующие пурпурные и зеленые серобактерии.

Нитчатые серобактерии представлены несколькими родами: *Beggiatoa*, *Thiothrix* и др. Представляют собой длинные нити, которые состоят из множества клеток, аэробы, подвижные и неподвижные, окисляют сероводород до серной кислоты.

Тионовые бактерии относятся к роду *Thiobacillus*. Это грамотрицательные палочки, подвижные, спор не образуют, окисляют серу и ее соединения.

Фотосинтезирующие зеленые и пурпурные серобактерии представляют собой различные морфологические формы — кокки, палочки, спиралилы, живут в строго анаэробных условиях и развиваются на свету при наличии в среде сероводорода или тиосульфита натрия.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какое значение имеют микроорганизмы в круговороте веществ в природе?
2. Какие микроорганизмы обуславливают аммонификацию белков?
3. Какие микроорганизмы обуславливают нитрификацию и денитрификацию?
4. Какие микроорганизмы обуславливают разложение клетчатки?
5. Расскажите о микроорганизмах, вызывающих гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение.
6. Назовите микроорганизмы, вызывающие пропионово-кислое и масляное брожение.
7. Какие микроорганизмы осуществляют превращение фосфора, железа и серы в природе?

## ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

### 5.1. ДЕЙСТВИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

**К** числу основных физических факторов, воздействующих на микроорганизмы, как в естественной среде обитания, так и в условиях лаборатории, относятся температура, свет, влажность, осмотическое давление, электричество, высушивание, лучистая энергия и др.

Температура окружающей среды является одним из важнейших факторов, влияющих на жизнь микробов. Каждый вид микроорганизмов может развиваться лишь в определенных пределах температуры. Самая низкая температура, при которой они еще могут развиваться, называется минимальной, самая высокая — максимальной; температура наиболее активного развития называется оптимальной.

По отношению к температуре микроорганизмы обычно подразделяются на три физиологические группы.

*Психрофильные* (от греч. *psychrio* — холодный, *phileo* — люблю) — для них минимальной является тем-

пература от 0 до 10°C, оптимальной в пределах 10–15°C и максимальной 25–30°C. К этой группе относятся плесневые грибы, бактерии, обитающие в почве полярных районов, в воде северных морей, а также в холодильных камерах, где происходит их естественный отбор.

*Мезофильные бактерии* (от греч. *mesos* — средний) — к ним относятся большинство сапрофитов и все патогенные микроорганизмы. Для них минимальной является температура в пределах от 5 до 10°C, оптимальной — температура от 25 до 35°C и максимум 45–50°C.

*Термофильные бактерии* (от греч. *termos* — теплый) — для них оптимальной является довольно высокая температура — от 55 до 65°C, максимальной — 70–80°C, температурный минимум — не ниже 30°C.

Термофильные микроорганизмы широко распространены в природе, встречаются в поверхностных слоях почвы, на поверхности растений, кормов. Они принимают участие в процессах самосогревания рыхло уложенных кормов, влажного сена и зерна, именно они активно участвуют при биотермическом обезвреживании навоза, когда вся масса разогревается до 70–80°C, в результате гибнут вегетативные формы бактерий.

Термофильные бактерии имеют большое значение и в пищевой промышленности, их наличие в пищевых продуктах свидетельствует о нарушении температурного режима пастеризации и стерилизации. Возможность существования термофилов при высокой температуре обусловлена особым составом липидных компонентов клеточных мембран, высокой термостабильностью белков и ферментов.

### 5.1.1. Влияние на микроорганизмы высоких температур

Применение высокой температуры является самым распространенным, удобным и надежным способом стерилизации — обеспложивания (*sterilis* — бесплодный) — уничтожения различных микробов и их спор в разнообразных объектах. Существуют разные способы

стерилизации при помощи высокой температуры: прокаливание на огне, стерилизация сухим жаром в печах Пастера (электрический сушильный шкаф), кипячение, стерилизация паром под давлением в автоклавах, без давления в аппарате Коха, тиндаллизация (дробная стерилизация в течение 5–6 дней при температуре 56–58°C), пастеризация — метод, предложенный Л. Пастером с целью сохранения биологической ценности молока, вина, различных консервов, которые прогревают при 80°C в течение 30 мин. При пастеризации погибают только вегетативные формы микробов, споры же сохраняются, поэтому, чтобы не допустить прорастания спор и размножения вегетативных клеток, пастеризованный продукт немедленно охлаждают и в дальнейшем хранят при низких температурах (2–6°C).

Большинство вегетативных микроорганизмов погибает при нагревании до 60–70°C в течение 30 мин во влажной среде, при нагревании до 80°C — за несколько минут, при достижении 100°C — от нескольких секунд до 1–2 мин. При высокой температуре во влажной среде бактерии гибнут быстрее, чем в сухой, так как пар способствует быстрой коагуляции белка. Это учитывают при стерилизации, так при действии сухого жара при температуре 160–170°C бактерии гибнут через 60–90 мин, а в автоклаве при действии пара под давлением в 1 атм при температуре 120°C — они гибнут уже за 20–30 мин. Высокие температуры вызывают гибель бактерий в результате коагуляции (денатурации) белков цитоплазмы и инактивации жизненно важных ферментов.

Бактерии в стадии споры являются термоустойчивыми, некоторые клостридии способны выдерживать кипячение в течение 5–6 ч, например *Cl. botulinum*, а бациллы *Bac. subtilis* — в течение 1–3 ч.

Споры дрожжей и плесневых грибов не так устойчивы к воздействию высоких температур, как споры бактерий, и погибают довольно быстро при 65–80°C. Однако не все клетки даже одного вида микроорганизмов погибают одновременно, среди них встречаются более и менее устойчивые, так как имеют значение индиви-

дуальные колебания устойчивости микробов к высокой температуре.

*Стерилизации* подвергаются также перевязочные материалы, хирургические инструменты, различные растворы. Система мер, полностью предотвращающих проникновение микроорганизмов в макроорганизм при ранении, хирургических вмешательствах, названа *асептикой*. Уничтожение микроорганизмов в ранах при помощи химических средств (йода, перекиси водорода, калия перманганата, метиленового синего, бриллиантового зеленого, азотнокислого серебра и др.) называется *антисептикой* (от греч. *anti* — против, *septikos* — гнилостный).

### 5.1.2. Влияние на микроорганизмы низких температур и их практическое использование

К низким температурам микроорганизмы малочувствительны. При низких температурах микробная клетка переходит в состояние анабиоза, в котором она может существовать несколько месяцев. Это относится к бактериям, дрожжам, плесеням и вирусам. Так, эшерихии остаются жизнеспособными при  $-190^{\circ}\text{C}$  до 4 мес., холерный вибрион при  $-45^{\circ}\text{C}$  — до 2 мес., возбудитель листериоза при  $-10^{\circ}\text{C}$  — до 3 лет. Существуют бактерии, которые сохраняют способность к росту даже после воздействия температуры жидкого водорода ( $-252^{\circ}\text{C}$ ).

Низкие температуры приостанавливают гнилостные и бродильные процессы. На этом принципе издавна было основано хранение мяса, рыбы, масла, молока и других продуктов в ледниках, погребах и холодильниках.

Возможность сохранения биологического материала при температуре от 0 до  $-76^{\circ}\text{C}$  имеет большое значение в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и пищевой промышленности. При низкой температуре хранят музейные штаммы вирусов и бактерий (молочнокислых и болезнетворных) и имеющих промышленное значение плесневых грибов и дрожжей.

Холодоустойчивость различных микроорганизмов колеблется в широких пределах. Существуют некоторые микроорганизмы, размножающиеся и при температурах ниже 0°C. Если в продукте сохраняется повышенная влажность, некоторые дрожжи и бактерии могут расти при -5°C, а отдельные разновидности *Cladosporium herbarum* и *Penicillium glaucum* — даже при -8°C.

Подавляющее же большинство микроорганизмов не способно размножаться при температуре ниже 0°C. Многие гнилостные бактерии и бактерии кишечнотифозного семейства прекращают свое развитие при 2–5°C. Молочнокислые и патогенные бактерии не размножаются при температуре ниже 10°C. Все перечисленные свойства должны знать микробиологи и технологи, производственная деятельность которых связана с производством сырья животного происхождения и хранением готовых продуктов питания.

### 5.1.3. Влияние высушивания

Высушивание оказывает губительное действие на многие микроорганизмы, так как сопровождается обезвоживанием цитоплазмы и денатурацией белков. Однако споры бактерий, микроскопических грибов, а также некоторые вегетативные клетки довольно устойчивы к высушиванию (в этот период вегетативные клетки просто не размножаются).

Высушивание применяют для консервирования кормов (сена, соломы), овощей, фруктов. На поверхности высушенных продуктов всегда находится много живых микроорганизмов, но активно развиваться они не могут. При нарушении режима хранения, при повышении влажности, они начинают интенсивно размножаться, выделяют ферменты, вызывая порчу продуктов.

**Лиофильная сушка.** Суть заключается в том, что живую взвесь бактерий, суспендированных в соответствующей стабилизирующей жидкости, разливают

по ампулам, замораживают при  $-76^{\circ}\text{C}$  (при такой температуре в цитоплазме не образуются кристаллы льда, разрушающие микробную клетку) и в условиях высокого вакуума массу далее подвергают высушиванию из замороженного состояния (т. е. происходит сублимация воды). В результате такого высушивания содержимое ампулы превращается в гигроскопичный порошок. Микроорганизмы в герметично запаиванной ампуле длительно сохраняют свою жизнеспособность, поэтому этот метод широко применяется для сохранения музейных культур бактерий, при производстве сухих биопрепаратов (пробиотики, глобулиновые препараты, живые вакцины). Небольшая часть микроорганизмов в результате лиофильной сушки в процессе замораживания все же гибнет, для того чтобы сохранилась большая часть микробной массы, технологический процесс замораживания должен проходить очень быстро (от 1 до 10 с).

Лиофильной сушке можно подвергать и пищевые продукты, которые после этого можно хранить более двух лет. Лиофильное высушивание обеспечивает сохранение витаминов, ферментов, белков, углеводов, т. е. биологической ценности продукта.

#### **5.1.4. Токи сверхвысокой частоты**

Характер нагрева токами сверхвысокой частоты (СВЧ) резко отличается от обычных способов нагрева. Однородное тело, помещенное в поле СВЧ, нагревается одновременно во всех точках, что позволяет достигнуть высокого нагрева в течение нескольких секунд. При облучении неоднородного объекта нагревание может происходить избирательно. Это зависит от сопротивления среды: чем больше плотность среды, тем быстрее происходит ее нагрев. Особенности этого способа нагревания делают весьма перспективным его применение для тепловой обработки пищевых продуктов.

### 5.1.5. Действие различных видов излучения на микроорганизмы

Действие различных видов излучения на микроорганизмы можно назвать холодной стерилизацией, так как при этом не происходит разрушения витаминов, денатурации белка стерилизуемого объекта и он сохраняет биологическую ценность. Различные виды излучений бактерицидно действуют на микробы. Однако степень этого действия зависит от вида лучевой энергии, ее дозы и длительности экспозиции.

**Действие ультрафиолетовых лучей.** В биологическом отношении наиболее интересны ультрафиолетовые лучи с длиной волны от 280 до 230 нм. Они обладают выраженным бактериостатическим и бактерицидным действием. В зависимости от дозы облучения и вида микроорганизма действие ультрафиолетовых лучей может быть губительным или мутагенным.

Лампы, излучающие ультрафиолетовые лучи с длиной волны 254 нм, широко применяют для стерилизации посуды, дезинфекции воздуха в микробиологических боксах, в школах, операционных.

В практических целях ультрафиолетовые лучи используют для стерилизации воздуха в цехах предприятий пищевой промышленности и дезинфекции воздуха животноводческих помещений, для стерилизации воды и молока, лабораторного оборудования и пищевой пленки, разрушающихся при действии высокой температуры. Ультрафиолетовые лучи также можно применять для стерилизации вакцин, сывороток и других биопрепаратов.

Биологическое действие ультрафиолетовых лучей вызывает изменения в молекулах нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), что проявляется в нарушении деления, возникновении мутаций и гибели клеток.

**Ионизирующее излучение** как метод холодной стерилизации применяют для уничтожения микробов на инструментах, в перевязочном материале, биопрепаратах — при этом не снижается их качество, как при высокотемпературной обработке. Механизм действия

рентгеновского излучения заключается в поражении генетического аппарата микробной клетки, что приводит ее к гибели или мутации.

**Влияние электричества.** Электричество малой и высокой частоты убивает микробы. Особенно сильное бактерицидное действие оказывают токи ультравысокой частоты, воздействие которых приводит к электрофорезу некоторых компонентов среды, образовавшиеся при этом соединения инактивируют микробную клетку.

### 5.1.6. Влияние ультразвука

Ультразвуком принято называть механические колебания с частотами выше 20 000 колебаний в секунду (20 кГц). УЗ-волны несут большую механическую энергию и вызывают в озвучиваемой среде ряд физических (сжатие и разрежение), химических (электрохимическое воздействие) и биологических явлений. Вследствие механического действия ультразвука происходит мгновенный разрыв клеточных оболочек и гибель микроорганизмов. Специфической особенностью УЗ-волн является их способность вызывать почти мгновенное механическое разрушение (дезинтеграцию) клеток, что нашло применение при извлечении внутриклеточных ферментов, токсинов, витаминов, РНК, ДНК и других компонентов клетки.

В практических целях ультразвук используют для стерилизации пищевых продуктов и дезинфекции предметов.

## 5.2. ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Химические вещества могут тормозить или полностью подавлять рост микроорганизмов. Если химическое вещество подавляет рост бактерий, но после удаления его рост бактерий вновь возобновляется, то говорят о ингибировании или бактериостатическом действии, т. е. задержке роста микроба, а не о его гибели.

При бактерицидном действии химический препарат вызывает гибель клеток. Бактерицидное действие химических веществ имеет огромное значение, так как именно эта способность учитывается при использовании химического вещества в качестве дезинфектанта.

Противомикробные вещества с учетом химического строения и механизма их бактерицидного действия на бактерии можно подразделить на следующие группы: окислители, галогены, соединения металлов, кислоты и щелочи, поверхностно-активные вещества, спирты, красители, производные фенола и формальдегида.

Химические вещества (хлор, серная кислота, гидроокись натрия, фенолы, формальдегид) широко используются для дезинфекции и химической стерилизации. *Дезинфекция* — уничтожение только патогенных микробов во внешней среде, а не всех микробов вообще, которые находятся на объекте. Оценка качества дезинфекции проводится бактериологическим методом. Обычно в качестве тест-микробов используют кишечную палочку (*E. coli*) как наиболее резистентного представителя палочковидных микробов, не образующих споры, и золотистый стафилококк (*Staph. aureus*) как наиболее резистентного среди кокковых микроорганизмов.

Для оценки качества проведенной дезинфекции с поверхности обработанных объектов делают смыв стерильным тампоном, затем нейтрализуют дезинфектант и тампон вносят в питательную среду. Дезинфекция считается удовлетворительной при отсутствии роста тест-микробов на питательной среде.

### **5.3. ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

Действие биологических факторов проявляется прежде всего в антагонизме микробов, когда продукты жизнедеятельности одних микробов вызывают гибель других. Антагонистические свойства наиболее выражены

у актиномицетов, у споровых бацилл (*Bac. brevis*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*) и некоторых других микроорганизмов.

Явление антагонизма микроорганизмов впервые открыл в 1887 г. французский ученый Л. Пастер. Одним из первых практических приложений антибиоза были рекомендации И. И. Мечникова регулярно принимать продукты, содержащие молочнокислые бактерии, для подавления гнилостной микрофлоры кишечника.

### 5.3.1. Антибиотики

История открытия антибиотиков такова: в 1870 г. русские врачи В. А. Манассеин и А. Г. Полотебнев обнаружили в культуре плесневого гриба *Penicillium* антибактериальное вещество и пытались его использовать в лечебных целях. В 1894 г. И. И. Мечников предложил использовать молочнокислые бактерии как антагонистов гнилостных бактерий для подавления размножения их в кишечнике человека.

П. Н. Лащенко в 1909 г. заметил, что куриное яйцо, вылитое в чашку, не разлагается до высыхания. Этот факт натолкнул ученого на мысль о том, что нативный белок обладает каким-то особым свойством, препятствующим развитию микробов. Им была опубликована работа «О свойстве куриного белка убивать и задерживать рост бактерий».

В 1922 г. А. Флеминг обнаружил, что такими же свойствами обладают слезы, слизь из носа, экстракты из животных тканей и назвал это вещество лизоцим, так как оно *лизировало* некоторые бактерии (лизоцим из куриного белка в 200 раз активнее, чем в слезе). Он же в 1929 г. изучал антибактериальные свойства зеленой плесени — гриба рода *Penicillium*. Но только в 1940 г. биохимик Э. Чейн выделил пенициллин из культуральной жидкости в чистом виде и установил его химическое строение, а медик Х. Флори впервые применил стойкую соль пенициллина с лечебной целью. С 1943 г. в США

было развернуто промышленное производство пенициллина, а в 1945 г. была присуждена Нобелевская премия А. Флемингу, совместно с Х. Флори и Э. Чейном. Это событие является выдающимся в области биологии и ознаменовало начало эры антибиотиков. Явление антагонизма в мире микробов привело к открытию антибиотиков.

*Антибиотики* (от греч. *anti* — против, *bios* — жизнь) — биологически активные вещества, вырабатываемые в процессе жизнедеятельности бактериями, актиномицетами, микроскопическими грибами, растениями и животными, обладающие свойством в минимальных количествах губительно действовать на микроорганизмы. Антибиотики могут оказывать на микроорганизмы ингибирующее или бактериостатическое (подавляющее рост и размножение) и бактерицидное (вызывающее гибель) действие.

Антибиотики используются как лекарственные препараты для подавления жизнедеятельности бактерий, микроскопических грибов, некоторых вирусов и простейших, вызывающих инфекционные болезни человека, животных и растений.

Большим преимуществом антибиотиков является их избирательная токсичность против бактерий, не повреждающая при этом клетки животного и человека. Это обусловлено тем, что их мишенью являются структуры, свойственные только микроорганизмам.

Антибиотики могут быть классифицированы по нескольким признакам: по происхождению, по химическому составу, по механизму антимикробного спектра и действия.

По происхождению антибиотики можно разделить на пять групп.

**1. Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками.** Микроскопические грибы и лишайники являются продуцентами активных антибиотиков. Так из культуральной жидкости плесневого гриба *Penicillium notatum* был выделен широко применяемый антибиотик пенициллин, из *Cephalosporium acremonium* — цефалоспорин.

**2. Антибиотики, образуемые актиномицетами.** Самое широкое применение в практике нашли антибиотики, образуемые актиномицетами: стрептомицин, неомицин, канамицин, эритромицин, рифамицин, нистатин.

**3. Антибиотики, выделенные из бактерий.** Группа антибиотиков бактериального происхождения менее обширна и имеет меньшее практическое значение, так как эффективность их значительно ниже, чем антибиотиков грибкового и актиномицетного происхождения. К ним относятся полимиксин, колицин, пиоционин, субтилин, грамицидин и др. Большинство этих антибиотиков токсично при парэнтеральном введении, поэтому их используют для наружного применения.

**4. Антибиотики животного происхождения.** Биологически активные вещества, выделяемые животными тканями, обладают не только антибиотическим действием, но и активизируют защитные силы макроорганизма. Названные свойства позволяют применять их для профилактики и лечения ряда заболеваний. К ним относятся эритрин, выделяемый из эритроцитов различных животных; экмолин, полученный из тканей рыб; лизоцим — полисахарид, полученный из яичного белка. Клетки некоторых тканей продуцируют интерферон, угнетающий жизнедеятельность многих возбудителей вирусных инфекций.

**5. Антибиотики растительного происхождения.** Многие растения выделяют летучие и нелетучие биологически активные вещества — фитонциды, способные обеспечить устойчивость растений к различным болезням. Фитонциды открыл Б. П. Токин в 1928 г. Наибольшими антибиотическими свойствами обладают фитонциды лука, чеснока, хрена, горчицы, алоэ, плодов можжевельника, почек березы, листьев черемухи и эвкалипта. Они инактивируют ряд жизненно важных ферментов и подавляют жизнедеятельность стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, протей и других микроорганизмов.

По механизму действия на микроорганизмы антибиотики можно разделить на несколько основных групп:

1) антибиотики, ингибирующие синтез бактериальной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин);

2) антибиотики, нарушающие функционирование цитоплазматической мембраны (полипептиды, полиены, грамицидин);

3) антибиотики, разрушающие рибосомальные субчастицы и сдерживающие синтез белка (тетрациклины, хлортетрациклины, аминогликозиды, макролиды);

4) антибиотики, избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот: ингибиторы синтеза РНК, ингибиторы синтеза ДНК.

Во всех странах мира возникла антибиотическая промышленность. Получение антибиотика начинается с поиска продуцента антибиотика. В основном это почвенные микроорганизмы, например при открытии тетрациклина было проведено исследование 2 млн образцов проб почвы.

В природе трудно найти мутант, образующий в избыточном количестве необходимый микробиологическому производству метаболит, поскольку такой мутант обычно нежизнеспособен. В настоящее время природные штаммы подвергают индуцированному мутагенезу, у них повышают производительность и активность методом генетической инженерии. Таким образом, гены таких штаммов выделяют, идентифицируют и клонируют. Выход пенициллина, например, у плесневого гриба удалось повысить в 10 тыс. раз, рибофлавина — у дрожжеподобного гриба — в 20 тыс. раз, а витамина В<sub>12</sub> — в 5 тыс. раз по сравнению с исходным штаммом.

В микробиологической промышленности применяются сотни видов микроорганизмов, к которым предъявляются следующие требования. Они должны:

1) расти на дешевых субстратах;

2) обладать высокой скоростью роста и давать высокий выход качественного продукта за короткое время;

3) иметь стабильные и генетически закрепленные полезные признаки;

4) быть безвредными для людей и окружающей среды. Например, только пять штаммов — *Aspergillus oryzae*,

*Asp. niger*, *Bac. subtilis*, *Sacch. cerevisiae* и *Kluyveromyces fragilis* могут быть использованы как источники ферментов для пищевой промышленности;

5) не вызывать появление антибиотикоустойчивых штаммов;

6) быть фагоустойчивыми.

Большим преимуществом антибиотиков является четко выраженная избирательность и специфический механизм противомикробного действия. В отличие от химических ядов, губительно действующих на клетки животного, антибиотики поражают преимущественно клетки микроорганизмов. Каждый антибиотик обладает определенным антимикробным спектром действия: существуют антибиотики с узким спектром действия, действующие на грамположительные бактерии (пенициллин, грамицидин), и антибиотики, имеющие широкий спектр антимикробного действия (левомицетин, тетрациклин и др.).

Антимикробная активность антибиотиков оценивается наименьшим количеством антибиотика, которое оказывает антимикробное действие, его принято выражать в международных единицах действия (ЕД) или в весовых единицах. Так, за единицу пенициллина принимают 0,6 мкг чистой кристаллической соли, а за единицу действия других антибиотиков — 1 мкг чистого сухого препарата.

В настоящее время известно более 5 тыс. антибиотиков, из которых в практике используются лишь около 50–100. Антибиотики применяют значительно шире, чем другие химиотерапевтические препараты. Основными причинами широкого применения антибиотиков являются специфический механизм их действия, эффективность в очень малых дозах, сохранение активности в условиях макроорганизма и быстро проявляющееся лечебное действие.

В отличие от химических ядов, губительно действующих на клетки самого животного, антибиотики поражают преимущественно клетки микроорганизмов.

### 5.3.2. Бактериофаги

Бактериофагами называют вирусы бактерий. Явление бактериофагии изучали Н. Ф. Гамалея (1898), Ф. Творт (1915), Д'Эрелль (1917). Д'Эрелль назвал эти вирусы бактериофагами (от *греч.* phagein — пожирать). Бактериофаги не вызывают болезни человека, животных и растений.

Бактериофаги широко распространены в природе, их можно обнаружить в почве, в сточных водах, экскрементах больных и здоровых животных, человека. Везде, где размножаются микроорганизмы, обнаруживают и паразитирующих в них фагов. Бактериофаги обнаружены более чем у 100 видов микроорганизмов (С. Я. Гайдамович, 1982).

Большинство фагов имеют своеобразную форму и состоят из круглой головки и длинного отростка. Размеры бактериофагов колеблются: головки от 60 до 100 нм, отростка от 100 до 200 нм. Головка состоит из белковой оболочки и заключенной в ней ДНК. Отросток фага представляет собой полый стержень, покрытый снаружи чехлом, обладающий способностью сокращаться. На конце отростка имеется базальная пластинка с зубцами и нитями, которые служат для адсорбции фага на чувствительной бактериальной клетке. Фаги адсорбируются к поверхности чувствительной клетки и через отросток вводят в клетку свою ДНК.

Вирулентный бактериофаг способен инфицировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать лизис (разрушение), сопровождающееся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий. Фаги поражают микроорганизмы только определенного вида, поэтому с помощью фага возможна индикация патогенных бактерий в исследуемом материале, пищевых продуктах, питьевой воде и т. д.

В связи с высоким специфическим действием бактериофаги нашли широкое и разнообразное применение. Их используют для терапии и профилактики целого

ряда инфекционных болезней: гнойных инфекций, сальмонеллеза, колибактериоза.

В молочной промышленности особенно большое значение имеют бактериофаги, которые паразитируют в клетке молочнокислых бактерий и вызывают их гибель. Их наличие в заквасках приводит к большим убыткам при приготовлении кисломолочных продуктов и сыра, получение которых зависит от своевременного и быстрого размножения молочнокислых бактерий. Как это происходит? Бактериофаг проникает в чувствительную клетку молочнокислых бактерий, размножается в ней, через 60–80 мин вызывает ее лизис и в окружающую среду выделяется от 50 до 150 новых частиц фага. Только строгое соблюдение асептики во время приготовления и хранения закваски кисломолочных бактерий позволяет избежать загрязнения культуры бактериофагом.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Что такое стерилизация, асептика, антисептика, дезинфекция, пастеризация?
2. В чем состоит механизм действия физических, химических и антибиотических веществ на бактерии?
3. В чем суть феномена бактериофагии? Что происходит в зараженной бактериофагом клетке?

# МИКРОБИОЛОГИЯ ВОДЫ И ВОЗДУХА

## 6.1. МИКРОФЛОРА ВОДЫ

**И**зучением водных сообществ занимается гидробионика. Возрастающий дефицит пресной воды на Земле заставляет обратить серьезное внимание на процессы формирования воды в водоеме и переработку водными микроорганизмами поступающих в водоем органических загрязнений.

Вода — естественная среда обитания микробов, основная масса которых поступает из почвы, воздуха с оседающей пылью, со сточными и промышленными водами, отбросами и т. д. Особенно много микроорганизмов в открытых водоемах и реках, нередко встречаются они в илистых отложениях океанов, морей, болот, минеральных водах. Их находят как в поверхностных слоях, так и на глубине до 10 тыс. м.

Микрофлору водоемов образуют две группы микроорганизмов:

1) *автохтонная микрофлора*, первоначально существующая и размножающаяся в воде микрофлора, для которой вода является естественной средой обитания (*M. roseus*, *Sarcina lutea*, *B. aquatilis communis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus*, *Spirillum*, *Leptospira*);

2) *аллохтонная микрофлора*, попадающая в воду при загрязнении из различных внешних источников (обитатели кишечника человека и животных — БГКП, энтерококки, а если они являются носителями патогенных бактерий, то и сальмонеллы, шигеллы и холерный вибрион).

Атмосферная, еще не сконденсировавшаяся вода практически не содержит бактерий. В осадках (дождь, снег, град) в момент попадания на поверхность земли часто уже можно обнаружить бактерии и тем больше, чем теснее контакт осадков с частицами пыли в воздухе. При этом содержание бактерий находится в интервале от менее 10 до нескольких сотен в  $1 \text{ см}^3$ . Осадки, попавшие с поверхности в сток, могут быть особенно обсеменены микробами на первом участке стока. Часто содержание бактерий в стоках с участков земли, используемой в сельском хозяйстве, составляет от нескольких сотен до миллиона в  $1 \text{ см}^3$ .

Образующиеся потоки в зависимости от наплыва воды содержат резко отличающееся друг от друга количество бактерий. В не подвергавшихся внешнему воздействию средних и нижних слоях потоков и в бурных течениях количество бактерий снова уменьшается, так как здесь могут действовать многочисленные факторы, способствующие уменьшению содержания бактерий: разбавление водой источников с небольшим содержанием бактерий, осаждение крупных органических частиц и гибель вегетативных форм бактерий.

Факторы самоочищения тем эффективнее, чем дольше воздействие седиментации, активности других микроорганизмов, температуры, солнечного света, токсических продуктов обмена веществ, органического запаса питательных веществ, недостатка кислорода и других факторов, которые способствуют уменьшению содержания бактерий в природных и искусственных водоемах. Микрофлора водоема в естественных условиях вписывается в установившееся биологическое

равновесие. Микроорганизмы играют важную роль в минерализации органических веществ в воде и, таким образом, являются важным звеном в круговороте веществ в природе. Количество автохтонных бактерий составляет от нескольких сотен до 1000 бактерий в 1 см<sup>3</sup> воды. Особенно большое количество бактерий находится на поверхности ила.

Различные атмосферные осадки питают подземные грунтовые воды. В результате фильтрации и адсорбции в грунте удерживаются не только проникающие бактерии, но и питательные вещества. В собственно грунтовых водах количество бактерий в 1 см<sup>3</sup> колеблется в интервале от менее 10 до нескольких сотен. Лишь изредка встречаются грунтовые воды, полностью свободные от бактерий. Доминируют здесь очень медленно размножающиеся формы, которые во многих случаях определяют условную стерильность воды.

Вода во всех своих формах представляет вторичный биоток, в котором в естественных условиях может устанавливаться биологическое равновесие. Чуждые бактерии (аллохтонные), которые попадают в воду из грунта, из гниющих растений, и в особенности из сточных вод, в виде аллохтонных намывов, приобретают решающее гигиеническое значение при использовании воды в качестве питьевой или даже в хозяйственных целях.

К постоянно живущим в воде микроорганизмам относятся: *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Micrococcus roseus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bact. aquatilis*, *Proteus vulgaris*, *Spirillum* и др. Кроме сапрофитов, в воде могут быть возбудители инфекционных болезней животных и человека.

Обнаружить конкретного возбудителя сложно, поэтому санитарную оценку воды дают по наличию в ней кишечной палочки (*E. coli*), которая является индикатором фекального загрязнения, — определяют бродильный титр, микробное число, коли-титр и коли-индекс воды.

*Бродильный титр* — наименьший объем воды, при посеве которого в глюкозную среду обнаруживается газообразование.

*Общее микробное число* или количество МАФАНМ устанавливают по количеству микроорганизмов, содержащихся в 1 мл воды. Водопроводная вода считается пригодной для питья, если общее число микробов в 1 мл не более 100, сомнительной — 100–150, загрязненной — 500 микробов и более. В воде колодцев и открытых водоемов в 1 мл не должно быть более 1 тыс. микробов.

Степень биологического загрязнения оценивают по коли-титру и коли-индексу. *Коли-титром* называется наименьший объем воды в миллилитрах или сухого вещества в граммах, в котором обнаруживается хотя бы одна кишечная палочка. Бродильный титр соответствует коли-титру в том случае, если сбраживание глюкозы вызывает *E. coli*, а не другие микроорганизмы.

*Коли-индексом* называется число кишечных палочек, обнаруженных в 1000 мл воды. По существующим нормативам вода считается качественной, если коли-индекс ее не более 3, а коли-титр не менее 300. Вода шахтных колодцев должна иметь коли-индекс не более 10, а коли-титр не менее 100. Для перевода коли-титра в коли-индекс 1000 делят на показатель коли-титра, а для перевода коли-индекса в коли-титр — 1000 делят на число, выражающее коли-индекс.

Питьевая вода для животных не должна содержать какие-либо патогенные бактерии, а количество сапрофитных микробов должно быть минимальным. Загрязненная вода представляет опасность, она может быть фактором передачи болезней.

При санитарно-микробиологическом исследовании качества воды определяют количество МАФАНМ, БГКП и наличие патогенных бактерий.

## 6.2. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды, откуда микробы вместе с пылью и капельками влаги увлекаются в атмосферу. Воздух является неблагоприятной средой для размножения микроорганизмов,

поэтому микробов, постоянно живущих в атмосфере, не существует. Отсутствие питательных веществ, солнечные лучи и высушивание обуславливают быструю гибель микроорганизмов в воздухе. Вследствие этого микрофлора воздуха не так обильна, как микрофлора почвы и воды.

Наибольшее количество микроорганизмов содержит воздух крупных промышленных городов. Воздух же полей, лесов, лугов, а также над водными пространствами, в удалении от населенных пунктов отличается сравнительной чистотой. Значительные изменения претерпевает микрофлора воздуха в зависимости от времени года. Максимальное количество микробов обнаруживают в июне-августе, а минимальное — в декабре-январе.

Состав микрофлоры воздуха разнообразен — это пигментные сапрофитные бактерии (микрোকки, сарцины), споровые (сенная, картофельная палочки), актиномицеты, плесневые и дрожжевые грибы. Наряду с сапрофитными в воздухе встречаются условно патогенные микроорганизмы, такие как гноеродные кокки, споры плесневых грибов из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*.

Количественный и качественный состав микрофлоры атмосферного воздуха претерпевает значительные колебания в зависимости от сезона года, климатических и метеорологических условий, а также характера почвы, удаления от поверхности почвы и общего санитарного состояния территории. Ветры способствуют обогащению воздуха микробами. Атмосферные осадки (дождь, снег) при прохождении через воздушные слои растворяют и адсорбируют находящиеся в воздухе взвешенные частицы с микробными клетками. В 1 мл дождевой воды, выпадающей в больших городах, содержатся тысячи бактерий, значительное количество микроорганизмов содержит также снег.

Основную массу микробов воздуха составляют сапрофитные виды, состав которых формируется в основном за счет почвенных микробов. В естественных условиях в воздухе обнаружено около 1200 видов бактерий и

актиномицетов, около 40 000 видов грибов, мхов, папоротников и др. В поверхностных слоях атмосферы преобладают плесени, вблизи земли преобладают бактериальные формы. Чаще из воздуха выделяют: *Bac. subtilis*, *Bac. megatherium*, *Bac. mycoides*, *Micrococcus candidans*, *M. flavus*, *Staphylococcus aureus*, *St. citreus*, *Sarcina alba*, *Torula alba*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Actinomyces* и др.

Вместе с пылью в воздух могут попадать патогенные микроорганизмы, выделяемые человеком и животными. В витающей пыли обнаруживают споры плесени и пигментные микробы, в осевшей пыли — анаэробы и споровые аэробы. Воздух имеет большое значение как фактор передачи возбудителей инфекционных болезней с воздушно-капельным механизмом передачи.

В животноводческих помещениях аэрозоли возникают при кашле, отфыркивании животных, также при чихании и разговоре обслуживающего персонала, во время раздачи кормов, особенно грубых. Размеры аэрозольных частиц могут колебаться в пределах от 10 до 2000 нм. Следовательно, в зависимости от размера капель, их электрического заряда аэрозоль может иметь капельную и пылевую фазы. Доказано, что в 1 м<sup>3</sup> воздуха помещений может содержаться до 6000 микробных клеток, в том числе и патогенных. Степень обсемененности воздуха микроорганизмами зависит от вентиляции, скученности животных, вида помещений, способа содержания животных и раздачи сухих кормов. В помещениях с плохой вентиляцией число микробов в 1 м<sup>3</sup> воздуха в 5–6 раз больше, чем в хорошо вентилируемых помещениях.

Санитарное состояние воздуха закрытых помещений оценивается по количеству МАФнМ — количеству микроорганизмов, обнаруженных в 1 м<sup>3</sup> атмосферного воздуха, а в помещениях для животных (коровниках, свинарниках, птичниках) мясо- и птицекомбинатов — по микробному числу и наличию санитарно-показательных микробов (СПМ).

Бактериологическое исследование воздуха осуществляется с использованием седиментационных, аспира-

ционно-фильтрационных (сорбционных) методов, основанных на осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхности твердых питательных сред или задержке их в жидкой среде путем сифонирования и барботажа. Допустимые санитарно-бактериологические показатели для воздуха животноводческих помещений не должны превышать 500–1000 бактерий в 1 м<sup>3</sup>.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Какая микрофлора обнаруживается в воде?
2. Какая микрофлора обнаруживается в воздухе и источники ее загрязнения?
3. Назовите методы исследования микрофлоры воды и воздуха.

## МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ

**П**осле рождения животный организм вступает в контакт с различными микроорганизмами, которые проникают через дыхательные и пищеварительные пути и заселяют желудочно-кишечный тракт, половые и другие органы. Постоянными обитателями тела животных являются микроорганизмы, одни из которых составляют облигатную микрофлору, другие находятся в организме временно, попадая из почвы, воздуха, с водой и кормом.

### Микрофлора кожи

Постоянные обитатели кожи — стафилококки, стрептококки, сарцины, актиномицеты, микрококки, вызывающие нагноительные процессы: фурункулы, гнойники, флегмоны и др.

Из палочковидных форм обнаруживают кишечную, синегнойную, псевдодифтерийную палочки.

## Микрофлора вымени

Микрофлору вымени составляют преимущественно микрококки (*M. luteus*, *M. flavus*, *M. caseolyticus*), стафилококки, стрептококки, коринебактерии, в частности *Corynebacterium bovis*. Внешняя кожа вымени из-за наличия грубых и мелких складок — место скопления практически всех микробов, которые обитают в животноводческих помещениях, на пастбищах, в подстилке, кормах, на руках доярки и других объектах внешней среды. При недостаточно тщательной уборке и дезинфекции помещения обычно обнаруживается более  $10^5$  микробов на  $1 \text{ см}^2$  кожи вымени, в результате чего вымя может стать одним из главных источников загрязнения выдоенного молока.

Из патогенных микробов на коже вымени часто встречаются возбудители маститов (*Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Staph. aureus*) и колимаститов (*Escherichia coli*).

## Микрофлора конъюнктивы

На конъюнктиве находят сравнительно небольшое количество микробов, что объясняется действием лизоцима в слезной жидкости. Среди обнаруженной микрофлоры чаще встречаются стафилококки, стрептококки, сарцины, микоплазмы, реже — актиномицеты, дрожжевые и плесневые грибы.

## Микрофлора дыхательных путей

У новорожденных животных в дыхательных путях микроорганизмов нет. При дыхании на слизистых оболочках дыхательных путей оседают из воздуха различные бактерии, микоплазмы, актиномицеты, плесневые и дрожжевые грибы и др. Больше всего бактерий находится в верхних отделах дыхательных путей и меньше в нижних, видовой состав зависит от обсемененности

микробами вдыхаемого воздуха. Постоянными обитателями слизистых оболочек носоглотки, зева в основном являются кокковые формы бактерий — стрептококки, стафилококки, микрококки, которые при снижении резистентности могут проникать в легкие и проявлять патогенное действие.

### **Микрофлора полости рта**

Она наиболее обильна и разнообразна, что объясняется благоприятными условиями: температура, щелочная реакция слюны, остатки измельченного корма. В ротовой полости обнаружено более 100 видов микроорганизмов, которые сосредоточены в зубном налете, между сосочками языка; состав микрофлоры зависит от вида, возраста, состояния животного, типа кормления. При кормлении грубыми кормами количество микробов в зубном налете травоядных животных невелико, при даче им сочных кормов и концентратов оно возрастает в десятки раз.

### **Микрофлора пищеварительного канала**

Она наиболее обильна. У новорожденных животных желудочно-кишечный тракт не содержит микробов. Через несколько часов после рождения организм животного заселяется микрофлорой, которая в процессе жизни может видоизменяться, но в основном остается стабильной до конца жизни животного.

### **Микрофлора однокамерного желудка**

Относительно бедна как по количественному, так и по качественному составу. Облигатной микрофлоры в желудке не может быть, это объясняется бактерицидным действием желудочного сока. В содержимом желудка

выживают споровые формы, кислотоустойчивые микробактерии, сарцины, молочнокислые бактерии, актиномицеты, энтерококки. При пониженной кислотности, а также при заболеваниях желудка в его содержимом развивается богатая флора гнилостных бактерий, дрожжей, плесневых грибов и другая несвойственная этому органу микрофлора. Состав микрофлоры желудка здоровых животных постоянно меняется и зависит от состава микрофлоры корма.

### **Микрофлора многокамерного желудка**

Очень богата, с кормом в рубец попадает огромное количество разнообразных видов эпифитной и почвенной микрофлоры. Содержатся они преимущественно в вегетативной форме, число их от 1 тыс. до 10 млн микробных тел, а по некоторым данным, до нескольких десятков миллиардов в 1 мл содержимого рубца. Здесь много гнилостных бактерий, возбудителей различных видов брожений.

Цельные компоненты грубых кормов были бы недоступны для использования, если бы в процессе эволюции не возникли симбиотические отношения с микробами, способными расщеплять клетчатку (целлюлозу).

Рубец и сетка — это большая бродильная камера, в которой имеются идеальные условия для роста многочисленных микроорганизмов: анаэробные условия, температура 37–39°C, непрерывная подача забуференного минерального раствора (70–80 л слюны в сутки), питательные вещества в виде хорошо измельченного богатого целлюлозой (клетчаткой) корма и механическое перемешивание в результате движения рубца. Под действием микробных ферментов-целлюлаз, расщепляющих целлюлозу до глюкозы, целлюлоза усваивается организмом. Среди обитателей рубца обнаружено 120 видов простейших и 150 видов микроорганизмов. В зависимости от вида корма соотношение между микроорганизмами и простейшими меняется. С функциональной точки зре-

ния наиболее важными являются бактерии, количество их в 1 мл содержимого рубца достигает 40 млрд. С кормом поступает много новых микроорганизмов, но они проходят транзитом, так как своя, облигатная, микрофлора не позволяет развиваться посторонним видам. Микробы, заселяющие рубец, расщепляют белки, нитраты, мочевины, синтезируют все витамины, за исключением А, Е, D.

### **Микрофлора тонкого кишечника**

Зависит от вида животных и характера кормления. Общим для всех видов животных является снижение количества микрофлоры, ослабление деятельности целлюлозных микроорганизмов. Здесь чаще всего обитают устойчивые к желчи энтерококки, ацидофильные, спорообразующие микробы, кишечная палочка, актиномицеты.

### **Толстый отдел кишечника**

Он наиболее обильно заселен микрофлорой. Постоянные обитатели — эшерихии, энтерококки, молочнокислые, бифидобактерии, целлюлозные бактерии, актиномицеты, термофилы, споровые формы, гнилостные бактерии; представителями факультативной микрофлоры являются стафилококки, стрептококки, клостридии, протей, кандиды, микроскопические грибы. В толстом отделе происходят сложные микробиологические процессы, дальнейшее расщепление составных частей корма. В 1 г содержимого находится 3–3,5 млрд микробных тел, составляющих до 40% массы сухого содержимого кишечника. Качественный состав микроорганизмов в просвете кишечника и на поверхности слизистых оболочек отличается, так как не все представители кишечной флоры способны к жизнедеятельности на поверхности слизистых.

## Микрофлора мочеполовых органов

На слизистой оболочке половых органов обнаруживают стафилококки, стрептококки, микрококки, дифтероиды, кислотоустойчивые микобактерии (*Myc. smegmae*) и др.

Матка, яичники, семенники, мочевого пузыря в физиологическом состоянии стерильны. При заболеваниях мочеполовых органов (метриты, эндометриты) микрофлора влагалища изменяется.

Таким образом, на поверхности тела животных, открытых и закрытых полостях постоянно присутствует разнообразная микрофлора, в основном безвредная, но иногда и патогенная. При нормальных условиях в организме поддерживается определенный полезный микробиоценоз. При снижении резистентности макроорганизма условно патогенные микроорганизмы, быстро развиваясь, вызывают болезни (пневмонию, энтериты).

### Нормальная микрофлора и ее физиологическое значение

- Нормальная микрофлора оказывает постоянное антигенное раздражение иммунной системы, поддерживает ее в физиологически активном состоянии, поэтому ей принадлежит важнейшая роль в формировании иммунологической реактивности организма;
- представители нормальной микрофлоры благодаря выраженной антагонистической активности предохраняют органы, сообщающиеся с внешней средой, от внедрения и безграничного размножения в них патогенных микроорганизмов;
- нормальная микрофлора в процессе жизнедеятельности синтезирует биологически активные вещества, такие как витамины группы В, К, аминокислоты, необходимые макроорганизму;
- благодаря деятельности клетчаткоразлагающих микроорганизмов, недоступная целлюлоза рас-

щепляется до глюкозы, летучих жирных кислот, которые используются организмом животного как источник энергии и материал для собственных пластических процессов.

Таким образом, при нормальном физиологическом состоянии взаимоотношения между макро- и микроорганизмами носят симбиотический характер и нормальная микрофлора при этом выполняет ряд весьма существенных и полезных функций.

Возникает вопрос: возможна ли жизнь животных без микробов? Со времен Пастера проводились попытки на лабораторных животных вывести безмикробных животных. Однако техника того времени не позволила решить эту задачу — безмикробные животные жили всего 20–30 дней.

В настоящее время развивается новая отрасль биологии — гнотобиология, изучающая безмикробную жизнь макроорганизмов. Гнотобиология — это область экспериментальной биологии и медицины, которая изучает, как влияет отсутствие микробов на жизнь живого организма. Эта проблема изучается на безмикробных цыплятах, белых крысах и мышах, морских свинках, поросятах и других животных, выращенных в специальных камерах путем скармливания стерильной пищи.

Внешне безмикробные животные ничем не отличаются от обычных. Однако у них менее развиты лимфоидная система, все внутренние органы по размерам меньше, но слепая кишка увеличенных размеров. Ввиду отсутствия кишечной микрофлоры выделения животных не имеют запаха.

Термин «гнотобиология» в том смысле, в котором он применяется, не совсем верен: безмикробных животных правильнее называть «аксенными», т. е. «без чужих». Гнотобиоты же — это животные, содержащие строго определенную микрофлору.

В заграничной сельскохозяйственной практике широкое распространение получили СПФ-животные, свободные только от патогенных микроорганизмов (SPF —

specific pathogen free), кишечник которых специально заселен лишь несколькими видами бактерий.

В отличие от гнотобиотов, СПФ-животные в ряде стран послужили ядром для создания племенных и товарных ферм, свободных от инфекционных болезней. Установлено, что СПФ-поросята развиваются на 30% быстрее обычных, смертность среди них снижается в 2 раза.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какая микрофлора характерна для кожи и дыхательных путей?
2. Какую микрофлору рубца вы знаете и какова ее роль в пищеварении?
3. Перечислите микрофлору толстого отдела кишечника.
4. Какое значение имеет нормальная микрофлора тела животных?
5. Что изучает наука гнотобиология?

## **ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ: КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ, ИХ РОЛЬ В ПЛОДОРОДИИ ПОЧВЫ**

**О**сновоположником современного научного почвоведения является В. В. Докучаев (1846–1903). По его представлению, почва — особое самобытное тело природы. В различных условиях образуются разные почвы, и они изменяются во времени. Докучаевым был сформулирован закон зональности, который может быть отнесен не только к почвам, но и ко всему живому миру Земли.

Разрабатывая научные основы почвоведения, В. В. Докучаев отмечал огромную роль живых организмов, и в частности микроорганизмов, в формировании почвы.

Период творчества В. В. Докучаева совпал со временем великих открытий Л. Пастера, показавших значение микроорганизмов в превращении разнообразных веществ. В конце прошлого и в начале текущего века был сделан ряд важных открытий в области микробиологии, имевших принципиальное значение для почвоведения и земледелия. Установлено, в частности, что в почве содержится огромное количество разных микроорганизмов. Это давало повод думать о существенной роли микробиологического фактора в формировании и жизни почвы.

Биологический аспект почвообразовательного процесса был разработан академиком В. Р. Вильямсом. Он считал, что отдельным почвенным типам свойственны специфические группировки микроорганизмов. Образование перегнойной почвы, являющегося основой ее плодородия, он тесно связывал с деятельностью микроскопических существ.

Интерес к микроорганизмам как факторам почвообразования и плодородия к концу XIX в. так возрос, что на VIII съезде естествоиспытателей и врачей в Санкт-Петербурге, состоявшемся в 1890 г., были заслушаны доклады, имевшие микробиологический аспект.

Известным микробиологом С. Н. Виноградским впервые был обнаружен анаэробный микроб, фиксирующий атмосферный азот, — *Clostridium pasteurianum*.

Длительное время с С. Н. Виноградским работал его ученик В. Л. Омелянский, который провел обширное исследование по методике изолирования чистых культур нитрифицирующих бактерий и установил их физиологические свойства. Им были изучены анаэробные целлюлозные бактерии, вызывающие метановое и водородное брожение. Последние работы были связаны с улучшением технологии мочки льна.

Большое внимание В. Л. Омелянский уделил микроорганизмам, связывающим молекулярный азот. Этому вопросу посвящена его монография «Связывание молекулярного азота почвенными микроорганизмами» (1923). Ученый интересовался геологической деятельностью микроорганизмов и другими процессами, ими вызываемыми.

Ученые следующего поколения внесли большой вклад в разработку методических приемов, позволяющих расширить представление о составе почвенных микроорганизмов, их физиологических функциях, экологии и т. д. Из них нельзя не упомянуть Н. Г. Холодного, Б. В. Перфильева, В. Н. Шапошникова, Н. А. Красильникова, Н. Н. Худякова, М. В. Федорова.

Широкие исследования по изучению биодинамики почв в географическом аспекте были начаты в 1920-х гг.

академиком С. П. Костычевым в созданном им Институте микробиологии ВАСХНИЛ. Это направление было развито во многих научных учреждениях нашей страны. Работа в области почвенной микробиологии интенсивно велась и за рубежом.

Совокупность полученных научных данных дает основание заключить, что почва представляет собой живую систему. В совершающихся в ней процессах микроорганизмы играют важную роль, без учета которой невозможно решение ряда хозяйственно важных вопросов.

Из всех объектов внешней среды наибольшее количество микроорганизмов содержит почва, так как в ней микробы находят благоприятные условия для своей жизнедеятельности: влагу, питательные вещества, защиту от губительного действия прямых лучей и т. п. Микрофлора почвы состоит из микробных популяций актиномицетов, бактерий, микроскопических грибов, водорослей и простейших.

Качественный и количественный состав микрофлоры различных почв значительно колеблется в зависимости от химического состава и физических свойств почвы, ее влагоемкости, степени аэрации, активной кислотности среды. Существенно влияют также климатические условия, способы сельскохозяйственной обработки, характер растительного покрова и многие другие факторы.

Качественный и количественный состав микроорганизмов почвы определяет ее плодородие. Плодородные, хорошо возделываемые почвы с большим количеством органических веществ содержат значительно большее число микроорганизмов, чем глинистые почвы и почвы пустынь.

Число микроорганизмов в 1 г почвы достигает колоссальных размеров: от нескольких тысяч в 1 г песчаной почвы до 5 млрд в черноземной.

Каждому типу почв свойствен характерный набор бактерий. В почвах севера более богато представлены гнилостные бактерии из рода *Pseudomonas*, очень часто присутствуют бактерии рода *Clostridium*. В почвах юга

они обнаруживаются в меньших количествах. В свою очередь представители родов *Arthrobacter*, *Spirillum* в большем числе встречаются в почвах южной зоны, а представители рода *Enterobacter* — в лесных почвах средней полосы.

Количество актиномицетов в 1 г почвы не превышает 10 млн. Некоторые актиномицеты распространены чрезвычайно широко. Вместе с тем имеются сведения, что почвы южной зоны не только богаче актиномицетами, но и имеют более разнообразный их видовой состав.

Микроскопические грибы встречаются в почве в количестве сотен тысяч и миллионов в 1 г почвы. Северные почвы, имеющие кислую реакцию, наиболее богаты грибами. Например, в тундре на 1 г почвы приходится 4 мг мицелия грибов, в лиственных лесах до 1 мг, а в почвах южной зоны 0,4–0,7 мг.

В почвах южной зоны родовой и видовой состав микроскопических грибов более разнообразен, чем в северных. В первых доминируют представители рода *Aspergillus*, а во вторых — *Penicillium*.

Северные почвы беднее, чем южные, плесневыми грибами рода *Fusarium*, которые особенно обильно размножаются в каштановых почвах и сероземах. Мукоровыми грибами богаты северные районы, однако некоторые роды — *Rhizopus*, *Choanephora* — более приспособлены к южным почвам.

В состав различных биогеоценозов входят дрожжи. В тундре основная часть дрожжей сосредоточена во мхах и торфе, в лесной почве много дрожжей в подстилке, в степной — в травяном опаде встречается до 14 видов родов: *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Phodosporidium* и др. В биогеоценозах полупустынь и пустынь дрожжи обитают не в поверхностных слоях почвы, а на некоторой глубине — ниже 20 см.

В формировании почвенного покрова существенную роль играют микроорганизмы, трансформирующие гумусовые соединения. К процессу разложения гумуса причастны бактерии родов: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*,

*Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Clostridium*, *Nocardia* и другие, а также грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus* и др.

Большую группу почвенного населения составляют диссипотрофы, которые участвуют в минерализации органических соединений. Относительная численность этой группы прокариот в северных почвах намного ниже, чем в южных. Значительная часть диссипотрофов отличается необычной морфологией и циклом развития. В эту группу входят почкующиеся бактерии, простекобактерии и стебельковые бактерии.

Весьма разнообразно представлены в почве хемолитоавтотрофные и фотолитоавтотрофные микроорганизмы, к которым относятся цианобактерии, нитрифицирующие бактерии и эукариотические водоросли.

Благодаря деятельности почвенных микроорганизмов в природе осуществляется непрерывный круговорот биогенных элементов. При этом в почве параллельно протекают противоположные биологические процессы — синтез и распад веществ, окисление и восстановление.

В составе микрофлоры почвы принято выделять так называемые физиологические группы микроорганизмов, которые участвуют в различных процессах и на разных этапах постепенного разложения органических веществ, к которым относятся:

1) аммонификаторы, являющиеся гнилостными микроорганизмами, вызывающими гниение остатков растений, трупов животных, разложение мочевины (*Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *S. marcescens*, *Proteus*, грибы рода *Aspergillus*, *Penicillium*; анаэробы — *Cl. sporogenes*, *Cl. perfringens*);

2) нитрифицирующие бактерии;

3) азотфиксирующие — клубеньковые и свободноживущие азотфиксирующие бактерии обладают исключительной способностью усваивать из воздуха атмосферный азот и в процессе жизнедеятельности образуют из молекулярного азота белки и другие органические соединения азота, которые используются растениями;

4) бактерии, расщепляющие клетчатку, вызывающие различные виды брожения, наблюдаемые при разложении микробами органических соединений углерода (молочнокислое, спиртовое, маслянокислое, уксусное, пропионовокислое, ацетонобутиловое и др.);

5) бактерии, участвующие в круговороте серы, железа, фосфора.

По наличию в почве некоторых микроорганизмов можно судить об интенсивности биохимических процессов, протекающих в почве. Например, в почвах с более энергичными мобилизационными процессами преобладают бациллы, использующие не только органический, но и минеральный азот (*Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megaterium*). Наоборот, в почвах со слабо протекающими минерализационными процессами преобладают спорообразующие бактерии — *Bac. cereus*, *Bac. mycoides* и микроскопические грибы родов *Penicillium*, *Dematium*.

Микроскопические грибы родов *Mucor*, *Fusarium* и дрожжи энергично размножаются в почвах с большим количеством свежих растительных остатков. Грибы рода *Alternaria* чаще встречаются в окультуренных, унавоженных почвах, занятых сельскохозяйственными растениями.

Распределение микроорганизмов в почве по вертикальному разрезу неравномерно. Меньше всего их содержится в самом поверхностном слое толщиной в несколько миллиметров, так как здесь они подвергаются неблагоприятному воздействию солнечного света. Наибольшее количество (в 1 г 1 млн и более) микробов находится в следующем слое почвы на глубине 5–15 см. При продвижении вглубь количество микробов уменьшается, так на глубине 1,5–6 м встречаются уже единичные микроорганизмы. По мере углубления в почву существенно меняется и качественный состав почвенной микрофлоры. Так, некоторые спорообразующие бактерии глубоко проникают в почву, а другие (*Bac. megaterium* и *Bac. mycoides*) остаются преимущественно в верхнем

слое. Среди микроскопических грибов также происходит дифференциация, например представители рода *Penicillium* предпочитают более глубокие слои, а грибы родов *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma* — поверхностные слои.

В почве, кроме сапрофитных микроорганизмов, постоянно обнаруживаются возбудители инфекционных болезней, которые попадают в нее с различными органическими отбросами в виде фекалий, навоза, мусора и т. п. Через почву могут передаваться возбудители туберкулеза, чумы, дизентерии, брюшного тифа, холеры, газовой гангрены, ботулизма, сибирской язвы, а также патогенные грибы и актиномицеты. Патогенные неспоровые формы (брюшно-тифозные, дизентерийные и др.) сохраняются в почве недолго от 2 недель до 12 мес. Спорообразующие бактерии в виде спор сохраняются десятилетиями, а иногда, как возбудители сибирской язвы, — веками (табл. 1).

Таблица 1

## Сроки выживания микробов в почве

Микробы, для которых почва является природным биотопом	Микробы, попадающие в почву с выделениями животных и человека	
	сохраняющиеся долго	сохраняющиеся сравнительно недолго
Клостридии ботулизма	Бациллы сибирской язвы	Сальмонеллы, шигеллы, вибрионы, бруцеллы
Возбудители глубоких микозов	Клостридии столбняка	Возбудители туляремии, туберкулеза, лептоспироза
Актиномицеты	Клостридии анаэробных инфекций	Возбудитель сапа
Некоторые возбудители микотоксинозов	—	Вирусы ящура, энтеровирусы

На сроки выживания патогенных бактерий в почве оказывают влияние многие факторы: тип почвы, время года, температура, воздействие окружающей экологии.

В почву с выделениями больных, а также с трупами животных, погибших от инфекционных болезней, со сточными водами попадают патогенные микроорганизмы. В связи с этим почва может служить источником распространения возбудителей инфекционных болезней, через почву загрязняются объекты окружающей среды, может происходить обсеменение сапрофитными и болезнетворными микроорганизмами сырья животного происхождения, кормов и пищевых продуктов.

Таким образом, почва является фактором передачи патогенных микроорганизмов. Из инфицированной почвы микроорганизмы могут попадать в грунтовые воды и открытые водоемы, которые, в свою очередь, становятся источником распространения инфекционных заболеваний. Учитывая эпидемиологическую роль почвы как фактора передачи инфекционных заболеваний человека и животных, обязательно проводят микробиологическое исследование почвы: при решении вопросов, связанных с планировкой и строительством населенных пунктов, водохранилищ, спортивных площадок, детских садов, больниц и школ.

Следовательно, качественный и количественный состав микрофлоры почвы определяет как ее плодородие, так и санитарное благополучие. Для определения общего количества микроорганизмов в почве применяется ряд методов: прямой подсчет клеток под микроскопом; высев на твердые и жидкие питательные среды. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки. Поэтому только применение комплекса методов может дать наиболее реальное представление о заселенности почв микроорганизмами.

## **8.1. РОЛЬ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПЛОДОРОДИИ ПОЧВЫ. ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ, ВНЕСЕНИЯ НАВОЗА И МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Химизация сельского хозяйства не уменьшает роли биологических факторов в земледелии. Использование их позволит более рационально применять минеральные удобрения. Поэтому следует учитывать достижения микробиологии, раскрывающей пути мобилизации и трансформации в почве питательных для растений веществ.

Внесение в почву минеральных и органических удобрений усиливает интенсивность микробиологических процессов, в результате чего увеличивается трансформация органических и минеральных веществ. Улучшается не только питание растений, но и изменяются условия существования почвенных микроорганизмов, которые также нуждаются в минеральных элементах. Без воздействия на микробиологические процессы почвы невозможно решить вопросы повышения коэффициента использования удобрений (особенно азотных), накопления «биологического» азота, рационального чередования культур в севообороте, установления времени детоксикации в почве пестицидов и т. п.

Существовала точка зрения, что длительное применение минеральных удобрений приводит к катастрофической потере гумуса и ухудшению физических свойств почвы. Однако экспериментальные материалы ее не подтвердили. Так, академиком Д. Н. Прянишниковым в начале XX в. на дерново-подзолистой почве был заложен опыт с разной системой удобрений. Были выделены деланки, где применяли отдельно различные минеральные удобрения и навоз. В результате было установлено,

что парующая земля оказалась бедной сапрофитными микроорганизмами, так как в нее поступало недостаточное количество органических веществ. Внесение минеральных удобрений активизировало деятельность бактерий, так в присутствии минерального азота легче разлагался и использовался микроорганизмами гумус. Навоз, являющийся прямым источником образования гумуса, как и следовало ожидать, оказал благоприятное действие на все группы сапрофитного микронаселения почвы.

В общем, минеральные удобрения в большей или меньшей степени стабилизируют уровень гумуса в зависимости от количества оставляемых пожнивных и корневых остатков. Богатый перегноем навоз этот процесс стабилизации еще более усиливает, а если навоз вносят в больших количествах, то содержание гумуса в почве возрастает.

Иногда внесение в почву минеральных удобрений, особенно в высоких дозах, крайне неблагоприятно сказывается на ее плодородии. Неблагоприятное действие минеральных удобрений было отмечено на легких малоплодородных песчаных и супесчаных подзолистых почвах.

Применение в течение ряда лет минеральных удобрений, содержащих NPK, существенно снизило численность микроорганизмов в почве. Не пострадали лишь микроскопические грибы. Внесение извести, и особенно извести с навозом, оказало весьма благотворное влияние на сапрофитную микрофлору. Изменяя реакцию почвы в благоприятную сторону, известь нейтрализовала вредное влияние физиологически кислых минеральных удобрений. В общем, микрофлора почвы и зеленые растения на изменение почвенного фона реагировали примерно одинаково.

Обобщение большого материала по использованию минеральных удобрений (И. В. Тюрин, А. В. Соколов и др.) позволяет сделать заключение, что их влияние на урожай связано и с зональным положением почв. В северных почвах, где микробиологические мобилизацион-

ные процессы протекают замедленно, сильнее ощущается дефицит для растений основных элементов питания и минеральные удобрения действуют более эффективно, чем в южной зоне.

При благоприятных климатических условиях количество микроорганизмов и их активность после удобрения почвы значительно возрастают. Усиливается распад гумуса, а вследствие этого увеличивается мобилизация азота, фосфора и других элементов.

### 8.1.1. Микробиология навоза

Навоз — экскременты животных, перемешанные с соломой, торфом и опилками. Навоз является ценным удобрением, повышающим плодородие почв и улучшающим их структуру. Состав и удобрительные свойства навоза зависят от вида животных, корма, подстилки, системы уборки и хранения.

В навозе содержится много органических соединений, поэтому он является благоприятной средой для развития различных микроорганизмов. Содержание бактерий в навозе может достигать до огромных величин, особенно при благоприятных условиях (аэрация, температура). В навозе всегда находятся микроорганизмы, принимающие участие в почвообразовательных процессах, такие как аммонифицирующие, нитрифицирующие, денитрифицирующие, клетчаткоразлагающие или целлюлозоразлагающие, актиномицеты, плесневые грибы и др.

Кроме перечисленных микроорганизмов, в навозе всегда есть представители нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных, такие как кишечная палочка, энтерококки, большая группа молочнокислых бактерий, клостридии.

Следовательно, с навозом в почву попадает огромное количество полезных микроорганизмов, что значительно усиливает микробиологические процессы в почве и навоз приобретает свойства органического удобрения благодаря жизнедеятельности микробов. Механический,

химический и микробиологический состав навоза постоянно изменяется, так как он зависит от вида животных, качества корма, времени года, метода хранения и многих других факторов. Например, известно, что конский навоз богаче азотом, а при скармливании животным концентрированных кормов получается навоз, как удобрение, более высокого качества.

Различают навоз: жидкий, полужидкий и твердый — чаще с подстилочным материалом. Жидкий навоз получается при гидравлическом методе уборки помещения (влажность до 93%). Полужидкий (пастообразный) с влажностью до 85% получается при содержании крупного рогатого скота и свиней без подстилки. Для получения твердого навоза животных содержат на подстилке из соломы или сфагнового торфа — влажность такого навоза 70–80%.

Ввиду содержания в нем значительного количества сапрофитных и патогенных микроорганизмов, которые в нем могут длительное время сохранять жизнеспособность, свежий навоз в качестве удобрения не применяют. Частично обезвредить навоз от патогенной микрофлоры, предупредить потери ценных веществ в нем можно путем правильного хранения. Существует несколько способов хранения навоза: под скотом, плотный (анаэробный), рыхло-плотный (аэробно-анаэробный) и рыхлый (аэробный).

*Хранение навоза под скотом* — чаще применяется в частном хозяйстве. При таком методе хранения он уплотняется, создаются анаэробные условия, поэтому микробиологические процессы идут спокойно, благодаря чему в навозе сохраняется большое количество ценных веществ. Недостатком этого метода является то, что в воздухе помещений накапливаются аммиак и другие газы, которые вызывают раздражение слизистых оболочек животных. Неубранный навоз может быть источником различных бактериальных и вирусных возбудителей, т. е. он создает антисанитарные условия в помещениях, поэтому их лучше очищать от навоза.

*Плотное (анаэробное) хранение навоза.* Навоз укладывают в специально отведенных местах — навозохранилищах. Его плотно укладывают в штабеля произвольной длины, шириной 3–4 м и высотой до 2 м. Навоз герметизируют со всех сторон слоем торфа или земли толщиной 15–20 см. При анаэробных условиях микробиологические процессы развиваются медленно и происходит незначительное повышение температуры до 25–35°C. При такой укладке навоз перепревает только через 7–8 мес., с обязательным включением летнего сезона в этот срок.

Регулярное микробиологическое исследование плотно уложенного навоза, хранившегося в течение 4 мес., показало, что количество бактерий к концу исследования уменьшилось в 7 раз, а количество актиномицетов и спорообразующих бактерий незначительно колебалось и осталось на прежнем уровне.

При *рыхло-плотном (аэробно-анаэробное) хранении* навоз укладывают рыхлым слоем, чтобы создать аэробные условия, при которых идут энергичные микробиологические процессы, температура повышается до 50–60°C за счет развития термофильных микроорганизмов и разогревшийся навоз сам уплотняется. Следующий слой навоза вновь укладывают рыхло — до образования штабеля высотой 2 м. При этом методе хранения азота теряется больше, чем при холодном способе.

При *рыхлом (аэробном) хранении* навоза создаются аэробные условия, что способствует активному развитию микробиологических процессов. Аммонификаторы первыми начинают процесс, они разлагают белковые вещества до аммиака, используемого аэробными нитрифицирующими бактериями, которые окисляют его до нитритов и нитратов, т. е. создают пищу для последнего звена — денитрификаторов. В глубоких слоях навоза в анаэробных условиях те же денитрификаторы восстанавливают соли азотистой и азотной кислот до молекулярного азота.

Микробиологические процессы при достаточной аэрации интенсивно протекают только на поверхности, в глубоких слоях перепревание навоза идет медленно.

В разогретой массе температура достигает 70–80°C, что приводит к гибели вегетативных форм сапрофитных и патогенных бактерий. При интенсивно протекающих микробиологических процессах происходят потери ценных веществ и среди них важных для растений — азота и фосфора.

**Биотермическое обеззараживание навоза.** Навоз, полученный от больных животных, может содержать возбудителей многих опасных болезней сельскохозяйственных животных и быть фактором передачи возбудителей инфекции и инвазии. Навоз служит защитой для микробов, вирусов и яиц гельминтов от различных вредных внешних воздействий. В естественных условиях возбудители инфекционных и инвазионных заболеваний животных длительно выживают в навозе.

При заболеваниях, вызванных вирусами и бактериями не образующими споры, а также при инвазионных болезнях навоз подвергают биотермическому обеззараживанию в навозохранилищах. Для создания аэробных условий и разогревания навозной массы в нее необходимо добавить соломенную подстилку. Солома способствует более рыхлой укладке навоза, лучшей аэрации его массы и развитию аэробных микробиологических процессов, выделяющих много тепла.

В начальный период в рыхло сложенной массе бурно развивается разнообразная мезофильная микрофлора — аэробные неспороносные бактерии, грибы и частично актиномицеты. Через несколько дней, когда температура навоза поднимется до 70–80°C, его уплотняют новым слоем. В результате подъема температуры и удаления воздуха из навоза, большая часть мезофильной микрофлоры отмирает. Некоторая часть актиномицетов и неспорообразующих бактерий переносит повышенную температуру в анабиотическом состоянии. Активно размножаться в разогретом навозе могут лишь термофильные и термотолерантные актиномицеты и бактерии. Они представлены в основном спорообразующими формами (*Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*). Целлюлозу в горячем компосте разлагает термофильная бактерия

*Clostridium thermocellum*. Обмен веществ в клетке термофилов идет очень интенсивно, что приводит к сильному разогреванию субстрата, в котором эти микроорганизмы размножаются.

Обезвреживание навоза биотермическим способом проводят в течение нескольких месяцев с обязательным включением в этот период летнего сезона. При температуре (70–80°C), создаваемой микробами, происходит гибель патогенных микроорганизмов, не образующих споры. Навоз, полученный от животных, больных и подозреваемых по заболеванию сибирской язвой, эмкаротом, бешенством, паратуберкулезным энтеритом и чумой крупного рогатого скота, обязательно сжигают.

### **8.1.2. Роль микроорганизмов в почвообразовании и поддержании почвенного плодородия**

Под плодородием почвы понимают ее способность обеспечивать данной культуре оптимальные условия роста и питания, т. е., другими словами, давать высокий урожай.

Фактическое плодородие почвы зависит от комплекса применяемых агротехнических мероприятий (выбор лучших сортов, применение удобрений и средств защиты растений, тщательная и своевременная вспашка, боронование) и физико-химических свойств почвы. Огромную роль в формировании плодородия почвы играют микроорганизмы, так как они непосредственно влияют на ее физиологические свойства, на баланс питательных веществ. Благодаря жизнедеятельности микроорганизмов в почве одновременно протекают взаимно противоположные процессы: разложение и синтез веществ, осуществление биогеохимического круговорота элементов, который имеет циклический характер.

В процессе фотосинтеза образуется органическое вещество, которое входит в состав живых организмов, а именно водорослей в океане, растений на суше. Эти организмы служат источником питания для животных и

микроорганизмов. При этом важные биологические элементы, такие как С, О, N, Р и т. д. в процессе превращения переходят в клетки потребителей — животных и микроорганизмов. Они в свою очередь сами могут служить источником питания для других организмов. Вследствие этого химические элементы передаются дальше и сохраняются в органических цепях питания нефотосинтезирующих организмов.

Чтобы снова стать доступными для фотосинтезирующих организмов, химические элементы в составе органических веществ должны опять перейти в неорганическую форму. Эти превращения происходят в значительной степени благодаря разложению растительных, животных остатков и самих микроорганизмов, а также их экзаметаболитов.

Попавшие в почву растительные остатки, отмершие клетки микроорганизмов и животных разрушаются под влиянием ферментов микроорганизмов либо до конечных продуктов ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ), либо до промежуточных — органические кислоты, аминокислоты, спирты и т. д. Таким образом химические элементы вновь становятся доступными для растений, других микроорганизмов, животных, т. е. включаются в новый цикл превращений.

Одновременно с разложением органических веществ в почве происходят и синтетические процессы. В результате жизнедеятельности микроорганизмов в почве накапливается глутаминовая, аспарагиновая и другие аминокислоты, витамины группы В, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, ауксины и другие соединения, столь необходимые для растений.

В результате синтетической деятельности микроорганизмов почва обогащается гумусовыми веществами. Гумус составляет 85–90% всего органического вещества почвы. Обладает структурностью, влагоемкостью, обогащен органическими и минеральными веществами, рядом микроэлементов, насыщен корнями растений, беспозвоночными, микроорганизмами. Он играет огромную роль в процессах почвообразования, в формировании профиля и создании структуры почвы, а плодородие

почвы непосредственно связано со структурой, которая определяет водный и воздушный режимы. Гумус улучшает тепловые свойства почвы, способствует поддержанию оптимального значения рН почвы, способствует концентрации микроэлементов, накапливает и сохраняет все основные элементы питания для растений.

Гумусовые соединения, несмотря на сложность их молекул, не являются абсолютно стабильными веществами. Хотя и медленно, они подвергаются разложению микроорганизмами. Вопрос о разложении гумусовых веществ в почве имеет огромное значение в земледелии, поскольку с ним связан переход потенциального плодородия в эффективное. Разложение гумусовых веществ играет большую роль в обеспечении высших растений азотом и элементами минерального питания.

Решающая роль в процессах разложения новообразованных веществ принадлежит микроорганизмам. В природных условиях разложение гумусовых веществ осуществляется комплексом микроорганизмов, в котором ведущую роль играют Р и N. Сочетание процессов минерализации, гумусообразования и распада гумусовых веществ предохраняет Землю как от скопления свежих органических остатков, так и от избытка гумусовых веществ.

Постоянный синтез и разрушение органических веществ, превращение минеральных соединений, иными словами, непрерывный круговорот биогенных элементов обеспечивают физиологические группы микроорганизмов.

Физиологической группой называется группа микроорганизмов, обладающих сходными физиологическими функциями и осуществляющих в природе один и тот же биохимический процесс, например разложение клетчатки, фиксацию молекулярного азота, окисление веществ и т. д. В одну физиологическую группу могут входить представители различных систематических групп. Так, группа аммонификаторов объединяет разные виды и роды бактерий, актиномицетов и плесневых грибов на основе единой функции — способности к разложению

органических азотсодержащих соединений. Наличие в почве определенных физиологических групп микроорганизмов: целлюлозоразлагающих, аммонифицирующих, нитрифицирующих, денитрифицирующих и других, является показателем ее плодородия. Поэтому при определении плодородия почвы проводят исследование на наличие в ней определенных физиологических групп микроорганизмов. Обнаружение и выделение из почвы микроорганизмов различных физиологических групп основано на применении элективных питательных сред.

При бактериологическом исследовании почвы обычно ограничиваются определением следующих показателей в почве:

- количество МАФАНМ в 1 г;
- коли-титра почвы;
- при строительстве детских лагерей, домов отдыха, новых животноводческих помещений в почве определяют наличие возбудителя сибирской язвы.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Из каких микробных популяций состоит микрофлора почвы?
2. Влияет ли качественный и количественный состав микрофлоры на плодородие почвы?
3. Какое количество микроорганизмов может быть в 1 г почвы?
4. Какие физиологические группы микроорганизмов участвуют в разложении органических веществ?
5. Какие патогенные возбудители могут находиться в почве?
6. Какие способы хранения навоза применяются?
7. Какие особенности укладки навоза применяются для его биотермического обезвреживания?

## МИКРОФЛОРА ПЛОДОВ, ОВОЩЕЙ И ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ

**П**лоды и овощи служат источником витаминов, минеральных солей, органических кислот, легкоусвояемых углеводов, незаменимых аминокислот, микроэлементов и других веществ, необходимых для организма человека.

Плоды (фрукты) и овощи представляют собой различные вегетативные (капуста, морковь, лук) и плодовые генеративные органы растений (огурцы, томаты, перцы), поверхность которых обильно заселена микроорганизмами. Эпифитная микрофлора представлена как типичными для данного вида растений микроорганизмами, так и случайными. Источником *типичной эпифитной микрофлоры* служат растения, семена, растительные остатки, почва, а *случайная микрофлора* может быть занесена ветром, водой, насекомыми, грызунами из почвы, а также с поверхности тары, упаковочных материалов и других объектов.

Широко распространены заболевания растений, вызываемые фитопатогенными микробами, которые в большинстве своем безвредны для человека. Но некоторые из них продуцируют токсины и поэтому могут служить причиной пищевых отравлений. Санитарно-гигиеническое значение микрофлоры растений определяется в основном

ролью, которую играют многие ее представители как возбудители порчи плодов и овощей, а также участием, которое они принимают в процессах квашения, мочения, ферментации и т. п.

На поверхности плодов и овощей постоянно содержится значительное количество микроорганизмов, падающих из воздуха, при соприкосновении с землей, загрязненными предметами, насекомыми. Микроорганизмы, способные здесь существовать, образуют так называемую эпифитную микрофлору, видовой состав и численность которой зависит от вида растений, климатических и прочих условий.

Содержание микроорганизмов на поверхности плодов и овощей в значительной степени определяется расстоянием их от почвы в период вегетации. Чем ближе плоды и овощи расположены к поверхности почвы, тем больше микроорганизмов выявляется на их поверхности. Поэтому количество микроорганизмов на овощах, как правило, значительно выше, чем на плодах. Особенно высока численность микроорганизмов на клубне- и корнеплодах —  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/г, в том числе БГКП —  $10^2$  КОЕ/г.

Нарушение целостности покровов создает благоприятные условия для проникновения микробов в глубину тканей, способных вызвать заболевание и гниение растений. Гниение и порча плодов, овощей, корне- и клубнеплодов вызываются преимущественно грибами, прорастающими в толщу тканей растения. Бактерии обычно включаются в этот процесс после того, как грибы продвинули его достаточно далеко. Это объясняется тем, что у растений, в отличие от животных, нет доступных для бактерий открытых полостей, что позволяет микробам жить и поддерживать свою численность на поверхности, не причиняя вреда растениям.

Микробное население плодов и овощей характеризуется специфичностью и большим разнообразием видов. На развитие микроорганизмов в плодах и овощах существенное влияние оказывают внешние условия (температура, влажность и т. п.), а также степень устойчивости растений, определяемая их ботаническим видом и сортом.

Наиболее распространены бактерии родов *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Zymomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clavibacter*.

Численность эпифитов и их специфичность обусловлены химическим составом, степенью доступности экссудатов, выделяемых плодами и используемых микроорганизмами в качестве питательных веществ. Например, груши и яблоки, выращенные в одном саду, существенно отличаются по количеству и видовому составу микроорганизмов, обитающих на их поверхности. В составе эпифитов груши преобладают дрожжи и кислотообразующие бактерии. На яблоках их численность не превышает  $10^2$  КОЕ/г, а на грушах — достигает  $10^5$  КОЕ/г. Это различие можно объяснить степенью доступности питательных веществ для микрофлоры на поверхности груши, в отличие от поверхности яблок, покрытых восковидным налетом, затрудняющим питание бактерий.

Широко распространенной группой являются молочнокислые бактерии. Они обитают на поверхности капусты, салата, огурцов, картофеля, малины, яблок, винограда и т. д. Из кокковых форм преобладают *Streptococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*. Среди палочковидных форм доминируют *Lactobacterium plantarum*, *L. brevis* и *L. fermentum*. В то же время молочнокислые бактерии очень чувствительны к наличию фитонцидов и антибиотических веществ, выделяемых некоторыми растениями, подавляющих их жизнедеятельность.

Поверхность плодов и ягод является естественным местообитанием таких микроорганизмов, как дрожжи родов *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Torula* и плесневых дрожжей родов *Pichia* и *Debaryomyces*. Многие представители этих родов — слизевобразующие и пигментные дрожжи, обладают врожденной устойчивостью к солнечному и ультрафиолетовому облучению.

Клубнеплоды легко обсеменяются в почве мезофильными бактериями рода *Clostridium*, отдельные виды которых обнаруживаются в 100% проб.

## **9.1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПОРЧИ ПЛОДОВ И ОВОЩЕЙ**

В период вегетации в естественных условиях в плодах, овощах, корне- и клубнеплодах преобладают процессы ассимиляции.

При зимнем хранении они остаются живыми, в них продолжается обмен веществ, но преобладают процессы разложения, так как пополнение израсходованных веществ и испаряемой воды становится невозможным. Плодоовощная продукция при хранении физиологически ослабевает и тем сильнее, чем энергичнее протекают в них жизненные процессы. Наступает сморщивание и увядание тканей плода, размягчение эпидермиса, нарушение структуры коллоидных систем.

Разнообразная биохимическая деятельность микроорганизмов обуславливает среди прочих процессов гидролиз клетчатки, крахмала и других полисахаридов, сбраживание сахаров с образованием органических кислот и спиртов, окисление этих соединений до углекислоты и воды, распад белков.

Многочисленные и разнообразные вирусные, бактериальные, а отчасти и грибковые заболевания, поражающие растения на корню, весьма актуальны для сельского хозяйства, так как причиняют большой экономический ущерб, но они сравнительно редко попадают в поле зрения санитарного врача.

Для профилактики порчи и болезней плодов и овощей производят дезинфекцию посевного материала, почвы, территории хранилищ. Важнейшим звеном в профилактике порчи является рациональный режим сбора, перевозки и хранения овощей и фруктов.

### 9.1.1. Микробиологическая характеристика плодов и овощей

На поверхности плодов и овощей постоянно обитают различные виды микроорганизмов. Среди поверхностной микрофлоры могут встречаться сапрофитные, фитопатогенные и патогенные для людей и животных микроорганизмы.

Характеристика количественного и качественного состава эпифитной микрофлоры плодоовощной продукции имеет большое теоретическое и практическое значение, так как лежит в основе разработки мер борьбы с ее потерями, обеспечивающих улучшение качества и безопасность продукции для здоровья потребителя, а также оптимальных технологических режимов переработки, обработки и хранения. Микроорганизмы, поражающие свежую плодоовощную продукцию в процессе производства, транспортировки, хранения, переработки и реализации, причиняют большой ущерб.

Пути и источники инфицирования этой ценной продукции весьма многочисленны и разнообразны. Основные из них: почва, вода, воздух, больные люди и животные, упаковочные материалы, инвентарь.

Из почвы на плодоовощную продукцию могут попадать бактерии, вызывающие желудочно-кишечные заболевания, палочки сибирской язвы, столбняка, ботулизма, холерный вибрион, патогенные дрожжи и многие другие патогенные микроорганизмы. В почве патогенные микроорганизмы довольно долго сохраняют свою жизнеспособность. В условиях комнатной температуры жизнеспособность некоторых из них составляет: сальмонелл и холерного вибриона до 7 дней. На землянике, клубнике и малине эти микроорганизмы не погибают 1–5 дней. Примерно такие же сроки они переживают на огурцах, редисе, зеленом луке, грушах, сливе, вишне, смородине, винограде.

Как в почве, так и в среде, окружающей плодово-овощную продукцию, могут встречаться сапрофитные и патогенные стафилококки. Одним из опаснейших для здоровья человека является *Clostridium botulinum*, который широко распространен в природе. Места обитания его — почва, откуда он попадает в воду, на плоды и овощи, плодовоовощную продукцию и другие пищевые продукты, а затем в кишечник человека и животных.

В результате исследований плодовоовощной продукции А. А. Кудряшовой (1986) установлено сравнительное количественное соотношение плесеней, дрожжей, бактерий группы кишечных палочек (БГКП) на поверхности яблок, груш, абрикосов, малины, земляники, зеленого горошка, перца, моркови. Количество спор плесеней на поверхности изученной плодовоовощной продукции колеблется в пределах  $20-7 \cdot 10^7$  клеток в 1 г, дрожжей  $1 \cdot 10^2-3 \cdot 10^7$ , бактерий  $1 \cdot 10^2-10^8$ , кислотообразующих бактерий  $10-5 \cdot 10^5$ , БГКП 1-100 клеток в 1 г. На поверхности яблок содержится минимальное количество микроорганизмов по сравнению с другими объектами. Это объясняется тем, что на их поверхности имеется восковой налет, затрудняющий питание микроорганизмов. До контакта этих плодов с упаковочной стружкой и тарой численность плесеней, дрожжей и бактерий на их поверхности бывает значительно меньше.

Количественный состав микроорганизмов на поверхности ягод зависит от температуры и метеорологических условий, методов уборки урожая, степени зрелости ягод, состояния тары и продолжительности их хранения. Так, полимерные и целлофановые упаковки способствуют активному размножению дрожжей и замедлению жизнедеятельности плесеней, особенно при низких температурах.

Отличительная особенность овощей заключается в том, что на их поверхности обитает значительно больше микроорганизмов, чем на плодах и ягодах. Еще больше микроорганизмов содержится на поверхности овощей, непосредственно контактирующих с почвой в процессе вегетации. Так, общее количество микроорганизмов, со-

держатся на поверхности моркови, в момент исследования исчисляется миллиардами. Такая высокая бактериальная нагрузка создает определенные предпосылки для более быстрого и активного развития микроорганизмов, вызывающих потери продукции при хранении.

Количество БГКП на плодах, ягодах и овощах зависит от пространственного расположения овощей над землей в процессе вегетации и наличии непосредственного контакта с ней. Например, единичные клетки БГКП обнаружены на яблоках, землянике, сладком перце, тогда как на корнеплодах моркови их численность на 1 г достигает несколько сотен, тысяч, а иногда и более.

В процессе хранения плодоовощной продукции до переработки и реализации в свежем виде численность микроорганизмов на ее поверхности увеличивается. Этот биологический процесс протекает независимо от температурных условий и исходного количества микроорганизмов на поверхности продукции. Темп размножения плесеней, дрожжей и бактерий на плодоовощной продукции определяется видовыми особенностями микроорганизмов и продукции, а также температурой и влажностью в помещениях для хранения. Механические и биологические повреждения плодоовощной продукции способствуют инфицированию сочной растительной ткани, увеличению количества микроорганизмов и потерям массы продукции. Повреждения поверхности плодоовощной продукции часто связаны с небрежной уборкой и обработкой урожая, нарушением температурно-влажностного режима (подмораживание, высыхание), состоянием тары, упаковочного материала.

Знание видовой характеристики микробного населения плодоовощной продукции позволяет судить о возможности опасной эпидемической ситуации, о доброкачественности продукции и выявлению наиболее активных и часто встречающихся возбудителей порчи продукции, выяснению закономерностей их распространения и развития. На поверхности плодоовощной продукции могут находиться микроорганизмы, не при-

чиняющие вреда продукции и людям, а также вызывающие у людей пищевые отравления и интоксикации. Из плесневых грибов довольно часто встречаются представители родов: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Monilia*, *Mucor*, *Rhizopus Penicillium*, *Fusarium* и др.

Грибы из рода *Penicillium* широко распространены в природе, они весьма устойчивы к воздействию многих физико-химических факторов. Токсины, продуцируемые 30 видами из этого рода (атрахинон, бутенолид, окротоксин, циклопептид, нонадрин), опасны для людей и животных.

Микотоксины плесневых грибов обнаружены в таких растительных продуктах, как арахис, арахисовое масло, пшеница, рис, сорго, соевые бобы, яблоки, морковь, фасоль, какао, ячмень и др. Микотоксины патогенных грибов обладают ярко выраженными мутагенными, тератогенными, канцерогенными и другими свойствами, негативно влияющими на здоровье людей. В связи с этим органами здравоохранения установлены ПДК (предельно допустимые концентрации) микотоксинов в растительных пищевых продуктах.

Многие микроскопические грибы, поражающие плодовоовощную продукцию, могут вызывать у человека повреждения кожи, легких, слизистых оболочек, лимфатических узлов и внутренних органов. Из мукооровых грибов свыше 15 видов вызывают у человека поражение легких и печени, кератиты, дерматомикозы.

Среди микрофлоры свежей плодовоовощной продукции весьма часто встречаются следующие виды спорообразующих бацилл: *Bac. mesentericus* (картофельная палочка), *Bac. megaterium* (капустная палочка), *Bac. subtilis* (сенная палочка), *Bac. mycoides*. Все перечисленные виды бактерий способны поражать овощи и фрукты.

Качественный состав микробного населения существенно влияет на товарные свойства плодовоовощной продукции, продолжительность хранения и эффективность применяемых способов обработки и хранения, а также определяет подход при выборе воздействий для борьбы с потерями продукции.

Способность микроорганизмов поражать плодоовощную продукцию определяется такими свойствами, как патогенность и вирулентность.

Под *патогенностью* понимают потенциальную способность микроорганизмов вызывать специфический процесс в тканях растений, развиваться в них и причинять определенный вред. *Вирулентность* — это степень патогенности определенного микроорганизма, его индивидуальный признак. Вирулентность микроорганизмов характеризуется способностью проникать в растение, преодолевать его сопротивляемость и использовать как среду обитания и размножения. Вирулентность может быть свойственна не всем штаммам данного вида, тогда как патогенность микроба или его способность причинять тот или иной вред хозяину — признак, свойственный виду.

Микробиологическая порча плодоовощной продукции начинается до того, как появляются визуально наблюдаемые признаки порчи. Продолжительность начального этапа зависит в основном от вида поражаемых плодов и овощей, а также видовых особенностей микроорганизмов и условий окружающей среды. Начальные этапы болезни характеризуются тем, что размер очага от точечного достигает нескольких сантиметров в диаметре, появляются новые вещества — метаболиты, иногда весьма опасные для здоровья людей.

Кроме того, различные виды плодов и овощей по-разному реагируют на внедрение садовых, полевых и складских возбудителей порчи. При внедрении складских видов микроорганизмов большинство плодоовощной продукции подвергается порче, а чаще организм растения разрушается полностью. Видимо, в процессе эволюции растений природный иммунитет формировался в большей степени к патогенным микроорганизмам, находящимся в окружающей среде. В результате адаптации и естественного отбора агрессивные складские виды микроорганизмов в течение длительных сроков остаются жизнеспособными и попадают на продукцию из окружающей среды, с поверхности тары, оборудования и инвентаря.

При хранении плодоовощной продукции должны быть созданы условия, угнетающие или полностью ингибирующие размножение и биохимическую деятельность микроорганизмов, а также замедляющие естественные физиологические реакции, протекающие в продукции.

## **9.2. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ СОХРАНЕНИЯ ПЛОДООВОЩНОЙ ПРОДУКЦИИ**

Слово «conservatio» в переводе с латинского означает сохранение. Основные способы консервирования: стерилизация, квашение (соление, мочение), замораживание, сушка. Следовательно, консервирование плодов и овощей представляет собой в полном смысле слова их сохранение. В узком смысле под консервированием подразумевают производство консервов в герметичной таре, тогда как под этим термином следует понимать использование различных способов сохранения плодов и овощей.

Методы консервирования делят на физические, химические, физико-химические, микробиологические и биохимические:

- к физическим относят термическую обработку (пастеризация, стерилизация, охлаждение и замораживание);
- химические основаны на добавлении к консервируемым продуктам консервантов, антисептиков и антибиотиков;
- физико-химические представляют собой сушку плодоовощной продукции, консервирование с помощью сахара;
- биохимические основаны на использовании естественных консервантов, продуцируемых микроорганизмами или накапливающихся в клетках растений (антибиотики, фитонциды);

- микробиологические методы консервирования плодоовощной продукции основаны на использовании молочнокислых бактерий и дрожжей. Для ингибирования бактерий, поражающих плодоовощную продукцию, можно использовать культуральные жидкости с метаболитами молочнокислых (квашение капусты, огурцов) и уксуснокислых бактерий (получение уксуса), а также некоторых плесеней, синтезирующих лимонную кислоту.

Для ингибирования плесеней, поражающих плодоовощную продукцию, рекомендуют применять пропионовую кислоту и ее соли, культуральные жидкости бактерий, продуцирующих антибиотические вещества или вещества, резко изменяющие рН среды в щелочную сторону.

### **9.2.1. Влияние способов консервирования на качество, пищевую ценность и сохранение плодоовощной продукции**

Способы консервирования оказывают большое влияние на качество, пищевую ценность и продолжительность хранения плодоовощной продукции. Выбор и применение тех или иных способов консервирования определяются видом и качеством сырья, назначением консервируемого продукта, техническими возможностями предприятия.

В результате термической обработки плодоовощной продукции инактивируется их биологическая ценность и теряются полезные свойства. Это обусловлено резким изменением формы и структуры тканей, консистенции и исходного химического состава продукции.

Консервирование сахаром, сублимационная сушка и замораживание меньше отражаются на изменении полезных свойств продукции.

Соление, квашение, мочение, маринование плодоовощной продукции также изменяют ее исходные свойства. Однако эти способы консервирования имеют ряд пре-

имуществ по сравнению с тепловой обработкой продукции и некоторыми другими способами. Микробиологические способы консервирования снижают содержание сахаров, но остальные вещества, полезные для организма человека, почти полностью сохраняются в продукции. При этом в результате жизнедеятельности микроорганизмов плодовоовощная продукция обогащается дополнительными биологически активными веществами различной природы (аминокислоты, витамины, минеральные элементы, органические кислоты, антибиотики и др.). Например, квашеная капуста в результате молочнокислого брожения приобретает приятный специфический аромат, сохраняет большое количество витаминов, минеральных элементов и других веществ.

Основные направления улучшения качества консервирования и сохранения полезных свойств плодовоовощной продукции следующие:

- применять высококачественное сырье для хранения и переработки;
- применять атермические способы обработки (лазерное и ионизирующее излучение);
- смягчение режимов пастеризации и стерилизации в результате предварительной обработки плодовоовощной продукции безвредными химическими веществами и ионизирующим излучением, а также добавлением к продуктам переработки низина, аскорбиновой кислоты и др.;
- применение быстрого и глубокого замораживания;
- внедрение сублимационной сушки;
- использование чистых культур микроорганизмов с повышенной биохимической активностью при солении и квашении продукции.

Большое значение имеет количественный и качественный состав микроорганизмов, находящихся на таре и упаковочном материале, с которыми контактирует плодовоовощная продукция.

На деревянной таре постоянно встречаются следующие роды плесеней: *Penicillium* (70%), *Sclerotinia* (12%), *Rhizopus* (8–90%), *Alternaria* (5%) и др. При хранении моркови в складских помещениях с нерегулируемой температурой плесени распространяются вначале на поверхности тары, а затем и на самой продукции, что приводит к ее массовой порче.

Таким образом, тара и упаковочный материал могут быть источником дополнительного инфицирования как свежей плодоовощной продукции, так и продуктов ее переработки.

### **9.3. МИКРОБИОЛОГИЯ БРОДИЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ**

Бродильные производства основаны на использовании жизнедеятельности микроорганизмов. Для каждого вида брожения подбирается определенная культура микроорганизмов и субстрат, благоприятный для ее культивирования, создаются условия, исключаяющие развитие посторонней микрофлоры. Широкое применение получили дрожжи, микроскопические грибы и различные виды бактерий. Наиболее древней отраслью бродильных производств является пивоварение.

#### **9.3.1. Технология пивоварения**

Пиво относится к пенистым слабоалкогольным напиткам (от 1,5 до 6 объемных процентов спирта), изготавливается спиртовым брожением суслу из солода, хмеля и воды, в которое иногда добавляют рис и сахар. Для понимания процессов пивоварения необходимо владеть специальной терминологией: дрожжи, солод, пивное сусло, хмель.

## Дрожжи

В пивоварении используют чистые культуры дрожжей, которые поступают на заводы из музейной коллекции Всероссийского научно-исследовательского института броидильной промышленности в виде чистой культуры в пробирках на плотных питательных средах, при этом на каждый вид дрожжей должен быть паспорт с описанием всех его морфологических, культуральных, ферментативных и производственных свойств. В условиях пивоваренных заводов чистые культуры хранят при температуре не выше 5–8°C и периодически, не реже 4 раз в год, пересевают на свежий сусло-агар.

Дрожжи, используемые в пивоварении, относятся к классу *Ascomycetes*, порядку *Endomycetales*, семейству *Saccharomycetaceae*, роду *Saccharomyces*, видам *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis*.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* относятся к дрожжам *верхового брожения* и используются редко, в основном для темных и специальных сортов пива.

Дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* осуществляют *низовое брожение* пивного сусла — оседая на дно броидильных емкостей. Эти дрожжи сохраняют активность при температуре 5–10°C, что важно для соблюдения условий технологического производства, поэтому применяются при приготовлении стандартного и сортового пива.

Дрожжи, применяемые в пивоварении, принято называть культурными, так как они обладают полезными признаками, приобретенными в результате длительного культивирования в определенных технологических условиях. Для получения высококачественного пива дрожжи должны обладать следующими свойствами:

- *высокой броидильной активностью*;
- *флокуляционной способностью* — медленно и полно оседать на дно броидильных аппаратов в конце главного брожения. Различия во флоку-

ляционных свойствах лежат в основе разделения дрожжей на *хлопьевидные* и *пылевидные*. Большим преимуществом хлопьевидных дрожжей является то, что они в конце главного брожения слипаются в комки-флокулы и при низовом брожении оседают, образуя плотный осадок, а при верховом — поднимаются на поверхность;

- *умеренной способностью к размножению*. Очень активное размножение дрожжей нежелательно, так как при этом расходуются питательные вещества сусла и образуется большое количество побочных продуктов;
- *стойкостью к неблагоприятным условиям и инфицированию*;
- *стабильностью морфологических и физиологических свойств*;
- способностью придавать пиву характерный вкус и аромат.

## Солод

Основным сырьем в производстве пива является ячменный солод. Для приготовления солода берут хорошо вызревшее зерно, обычно ячмень, увлажняют его, чтобы вызвать прораствание или осоложение. Только в процессе проращивания ячменя в зерне образуются ферменты амилаза и протеаза. Амилаза расщепляет в зерне недоступный крахмал на более простые углеводы, в основном на мальтозу и декстрин. Протеаза превращает содержащийся в зерне белок в усвояемые дрожжами азотистые соединения. Без процесса осоложения ячменя пивоварение невозможно, так как пивные дрожжи не образуют амилазу и протеазу, поэтому крахмал и белок, содержащийся в зерне, были бы недоступны для дрожжей. Затем ростки проросших зерен механически удаляют, полученный солод высушивают и дробят.

## **Пивное сусло**

Пивное сусло готовят из раздробленного солода, его затирают, смешивают с горячей водой, получается затор или пивное сусло разного состава, который является основой для получения разных сортов пива. Таким образом, пивное сусло представляет собой сахаристую жидкость, содержащую в большом количестве мальтозу, декстрины и азотистые соединения. То есть пивное сусло является полноценной питательной средой для дрожжей, именно в нем происходит размножение дрожжей и процесс спиртового брожения.

## **Хмель**

Это род одно- и многолетних лиан семейства Тутовых, выращивают во многих странах мира. Хмель обыкновенный — это женское соцветие, имеет вид рыхлых шишек, широко используется в пивоварении, медицине и косметике.

Компоненты хмеля переходят при варке в сусло и придают пиву приятную горечь, специфический вкус и аромат. Экстракт из шишек хмеля обладает антимикробными, консервирующими свойствами и, кроме этого, придает пиву способность образовывать стойкую пену.

## **Вода**

К воде предъявляются особые требования по бактериальной чистоте, количеству бактерий группы кишечной палочки и степени жесткости, если она жесткая, то эту воду специальными средствами очищают и смягчают.

После соединения всех перечисленных и подготовленных компонентов готовый затор фильтруют и кипятят с шишками хмеля, чтобы уничтожить постороннюю микрофлору, после кипячения сусло фильтруют, осветляют, охлаждают до определенной температуры и вносят

закваску, представляющую собой чистую культуру пивных дрожжей *Sac. carlsbergensis*. Применяют преимущественно хлопьевидные дрожжи низового брожения, только для выработки некоторых специальных сортов пива используют расы дрожжей верхового брожения.

В процессе выработки пива различают два периода брожения пивного сусла: главное и дображивание.

В первый период (температура 6–10°C) для стимуляции роста и размножения дрожжей засеянное пивное сусло аэрируют, при наличии кислорода дрожжи активно размножаются и интенсивно сбраживают сахар (в среднем в процессе брожения биомасса дрожжей увеличивается в 3–4 раза). После достижения нужной концентрации дрожжей аэрацию прекращают и создают анаэробные условия, благоприятные только для спиртового брожения. Брожение, вызываемое низовыми дрожжами, протекает более спокойно и медленно, особенно если его ведут при сравнительно низкой температуре. Газ выделяется постепенно, пены образуется меньше, дрожжи не выносятся на поверхность сбраживаемой среды и оседают на дно бродительных емкостей. Полученное незрелое «зеленое пиво» сливают с осадка, состоящего из погибших дрожжей, и направляют на дображивание при температуре 0,5–1°C не менее чем на 90 дней. При такой температуре дрожжи почти не размножаются и медленно дображивают оставшийся сахар. В результате брожения накапливается 3–6% этилового спирта, CO<sub>2</sub> и побочные продукты (высшие спирты, органические кислоты, диацетил, эфиры), участвующие в формировании вкуса и аромата пива.

Таким образом, химический состав и вкусовые свойства разных сортов пива зависят от особенностей и качества используемого сырья, применяемой расы дрожжей и технологии производства.

Созревшее пиво осветляют, фильтруют или центрифугируют для освобождения от дрожжей, пастеризуют 30 мин при температуре 70°C, при этом, чем выше температура, тем больше микробов погибает и увеличивается срок хранения пива, но высокая температура плохо сказывается на вкусе пива. Далее пиво разливают в потребительскую тару.

## **Микрофлора пивоваренного производства**

В работе применяют чистые культуры или засевные дрожжи — это дрожжи, предназначенные для засева бродильных чанов, качество их подвергают регулярно микроскопическому контролю. В 1 мл дрожжевой закваски должно быть 120–140 млн клеток, определение количества дрожжевых клеток проводится с применением камеры Горяева.

В сусло и пиво в производственном процессе попадает немало различных посторонних микроорганизмов из сырья, воздуха, воды, аппаратуры, а также с засевными дрожжами. Наличие спирта и  $\text{CO}_2$ , антимикробные свойства экстракта хмеля, низкий показатель рН ингибируют развитие многих возбудителей порчи, но имеются микроорганизмы, способные размножаться и в этих субстратах. Они выделяют продукты жизнедеятельности, угнетают производственные культуры дрожжей, в результате снижается качество получаемого продукта.

## **Микробиологический контроль пивоваренного производства**

Микробиологический контроль является важнейшим участком работы по оценке качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции на пивных заводах. Он осуществляется на всех технологических стадиях и включает объекты, наиболее важные и уязвимые в микробиологическом отношении. Наиболее важными микробиологическими показателями являются общая бактериальная обсемененность (количество МАФАнМ) и наличие бактерий группы кишечной палочки (БГКП). Производственный микробиологический контроль включает несколько пунктов.

**Контроль качества засевных дрожжей (закваска).** Из разводки чистых культур готовят препарат и под микроскопом определяют наличие в них посторонних микроорганизмов и мертвых клеток. Производствен-

ные засевные дрожжи исследуют ежедневно: проверяют морфологию клеток, содержание мертвых клеток, гликогена, определяют присутствие посторонних микроорганизмов. Количество мертвых клеток в засевных дрожжах не должно превышать 5%, а количество бактерий — 0,5% и диких дрожжей — 1%.

**Контроль сусла.** При микробиологическом контроле сусла в нем определяют биологическую стойкость. Пробы сусла, отобранные в нескольких повторностях в стерильные пробирки, помещают в термостат с температурой 20°C. Стойкость сусла является хорошей, если через 4 сут нет помутнения, и плохой — если помутнение наблюдается уже через 24 ч.

После определения стойкости проводят микроскопический контроль, определяют основные группы микроорганизмов, вызвавших изменения в сусле. Определяют в сусле также общую бактериальную обсемененность (количество МАФАНМ) и содержание кислотообразующих микроорганизмов.

**Контроль молодого пива.** Проводят в случаях нарушения нормального хода главного брожения с целью выявления причин нарушения. При этом за 7 сут до окончания дображивания определяют биологическую стойкость молодого пива. Появление пленки, осадка, гнилостного или кислого запаха через 2–3 сут свидетельствует о микробной обсемененности молодого пива. Этот анализ помогает прогнозировать качество готового пива.

**Контроль готового пива.** Готовое пиво проверяют на биологическую стойкость, а также определяют общую бактериальную обсемененность (количество МАФАНМ) и наличие БГКП. Биологическая стойкость каждого сорта пива характеризуется временем (в сутках), в течение которого не выявляется развитие в нем микрофлоры. Если обнаружена плохая стойкость, то определяют количество МАФАНМ — в пиве не должно быть более 100 клеток в 1 мл.

**Контроль воды и материалов.** Устанавливаются нормы обсемененности каждого объекта. Так, например, количество микроорганизмов в смывных водах

после дезинфекции оборудования должно быть близким по микробиологическим показателям водопроводной воды, бактерии группы кишечной палочки должны отсутствовать.

### **Микроорганизмы – вредители пивоваренного производства**

Производство пива ведется в нестерильных условиях, поэтому в течение технологического процесса в сусло, молодое и готовое пиво могут попадать разнообразные микроорганизмы. Положение спасает то, что пиво обладает естественной биологической стойкостью за счет бактерицидных свойств хмеля, низкой температуры брожения, низкой кислотности (рН 4,6–5,4), анаэробных условий производства и наличия этилового спирта.

Источниками посторонней микрофлоры при производстве пива являются сырье, вода, воздух, дрожжи, аппаратура, вспомогательные материалы, а также руки и спецодежда работников.

Бактерии рода *Pseudomonas*, спорообразующие *Bacillus* и *Clostridium*, микроскопические грибы попадают в пиво из ячменя и солода, молочнокислые палочки, микрококки, уксуснокислые бактерии, БГКП и дрожжи попадают из сусла.

Микроорганизмы, вызывающие пороки пива:

- *молочнокислые палочки* вызывают помутнение и прокисание, а иногда и ослизнение, ухудшение вкуса и аромата пива;
- *пивные сарцины* хорошо развиваются в анаэробных условиях, они вызывают появление опалесцирующей мути, мелкозернистого осадка, ослизнения, появления в пиве неприятного вкуса;
- *микрококки* легко приспосабливаются к анаэробным условиям, скапливаются в дрожжевых осадках бродильных и лагерных танков, вызывают помутнение пива и изменение его вкуса;

- *уксуснокислые бактерии* относятся к аэробным микроорганизмам и начинают размножаться даже при незначительном содержании кислорода. Они образуют на поверхности пива пленку, снижают содержание спирта, окисляя его в уксусную кислоту, некоторые виды образуют помутнение, слизь и придают тягучесть пиву;
- *бактерии группы кишечных палочек (БГКП)* могут попасть в производство с недоброкачественной водой, с засевными дрожжами, при нарушении правил личной гигиены работников цеха. Обычно размножаются в сусле, придавая пиву запах вареной капусты. В самом пиве БГКП не могут размножаться, но сохраняются в течение 2–3 недель;
- *дикие дрожжи* — опасные вредители производства, так как являются антагонистами культурных дрожжей, сильно ухудшают органолептические качества пива. Чаще из пива выделяются дрожжи родов *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis* и др.

Для увеличения сроков хранения готового пива его подвергают пастеризации. Первые микробиологические работы Пастера как раз, были посвящены поиску возбудителей «болезней пива и вина», он первым разработал методы пастеризации вина и пива, поэтому Пастера можно считать родоначальником технической микробиологии.

### 9.3.2. Микробиологические основы виноделия

Виноделие также относится к древним производственным процессам. В узком смысле слова «вино» представляет продукт, полученный в результате спиртового брожения виноградного сока. Брожение — это сложный химический процесс, который вызывают дрожжи из рода *Saccharomyces*, чаще применяются дрожжи *Sacch. ellipsoideus*, *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. vini*, *Sacch. oviformis*, обладающие способностью разлагать сахара на спирт и углекислый газ с незначительным выделением тепла.

Спиртовое брожение является основой основ виноделия. Главная роль при брожении виноградного сусла принадлежит дрожжам. Под влиянием диких дрожжей, всегда имеющих на поверхности спелых ягод и плодов (эпифитная микрофлора), брожение сока может возникнуть самопроизвольно.

Виноградный сок является прекрасной питательной средой, так как содержит легко сбраживаемые углеводы (глюкозу, фруктозу, сахарозу), а также азотистые вещества и витамины. Поэтому в соке могут развиваться различные микроорганизмы, в том числе бактерии, которые могут изменить вкус и снизить качество готового продукта.

Поддержание штаммов дрожжей для приготовления посевного материала является специальной задачей винных микробиологов. Различные расы *Saccharomyces*, селекционированные для определенных типов вин, обладают различным температурным оптимумом брожения, образуют неодинаковое количество спирта (от 10 до 18 объемных %) и побочных продуктов, что отражается на вкусовых и ароматических свойствах вина.

Поэтому в качестве основного возбудителя спиртового брожения используют только чистые культуры дрожжей, обладающие *ценными производственными свойствами*. На крупных винодельческих предприятиях при выборе штаммов дрожжей для приготовления лабораторных и производственных заквасок предъявляют определенные требования:

- винные дрожжи должны сбраживать сусло при 13–15°C, так как брожение следует вести при низких температурах;
- винные дрожжи должны быть устойчивыми к высоким концентрациям спирта (до 18%), так как образование большого количества спирта препятствует развитию посторонней микрофлоры;
- дрожжи должны быть кислотоустойчивыми, так как брожение протекает при титруемой кислотности 8–10 г/л в пересчете на винную кислоту;

- засевные дрожжи должны выпадать в осадок и сбраживать сусло в условиях недостатка азотистых веществ.

Чистые культуры винных дрожжей различных рас выделены и селекционированы для определенных типов вин. Выращивание чистой культуры засевных винных дрожжей проводят на стерильном виноградном сусле, содержащем 16–20% сахара с внесением азотистого питания (фосфорнокислый двузамещенный или хлористый аммоний).

Массу засевных дрожжей постепенно увеличивают последовательными посевами от объема пробирки до баллона с 5–7 л кипяченого сусла. Продолжительность приготовления лабораторной разводки — 5–6 сут при температуре 20–25°C. Далее лабораторную разводку переносят в бочку с суслом емкостью 200–250 л, где проводят разбраживание также при 20–25°C в течение 2–4 сут до наступления активного брожения. Далее содержимое из этих бочек переносят в объеме 3–5% к сбраживаемому суслу в основные бродильные емкости.

Различают вина, полученные на крупных винодельческих заводах, и вина, приготовленные на мелких частных предприятиях.

1. Способы приготовления вина на винодельческих заводах и частных предприятиях различны, но схема технологического процесса производства вина одна. В пастеризованный сок вносят чистую культуру винных дрожжей, засеянный сок вначале аэрируют, так как при доступе воздуха дрожжи начинают усиленно размножаться. Этот процесс ведут под постоянным контролем, так как при длительной аэрации весь сахар и спирт, находящиеся в сусле, могут разложиться до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Поэтому после образования достаточной массы дрожжей аэрацию прекращают и спиртовое брожение продолжают в анаэробных условиях, чтобы образовалось больше этилового спирта — до 7–15 объемных %. Затем молодое вино разливают в большие бочки, в процессе хранения видимые частицы, содержащиеся в вине, оседают, а вино осветляется и созревает. Изменения, происходя-

щие в процессе созревания вина, представляют собой сложные физико-химические процессы, связанные с воздействием ферментов на компоненты вина.

2. Частные виноделы при производстве вина традиционно используют «дикие дрожжи», т. е. те дрожжи, которые находились на поверхности ягод и фруктов. Раздавленный виноград помещается в чаны, где будет происходить брожение сусла под влиянием «диких дрожжей». В ближайшие дни на поверхности сусла при температуре 12–14°C и выше появляются пузырьки углекислого газа — это признак начавшегося спиртового брожения.

Хотя в соке фруктов обычно содержатся различные микроорганизмы, тем не менее при благоприятных для образования вина условиях в бродящем соке начинают быстро преобладать дрожжи. Рост многих посторонних микроорганизмов в бродящей массе подавляется действием винной и яблочной кислот, а также другими компонентами.

Через 1–2 дня брожение становится бурным, на поверхности субстрата образуется масса пены. Через 3–4 дня молодое вино по окончании так называемого главного брожения наливают в бочки, отверстия которых шпунтуют, т. е. закрывают пробкой с вставленной в нее U-образной трубкой с водой, которая играет роль гидравлического затвора, препятствующего проникновению наружного воздуха в бочку. Внутренний воздух в бочке, содержащий кислород, при продолжающемся брожении постепенно вытесняется. Атмосфера углекислоты создает элективные условия и предохраняет вино от развития уксуснокислых бактерий и закисания.

Дображивание вина проводят в подвалах при низкой температуре (около 10°C). Постепенно, спустя 2–3 недели, брожение затихает, дрожжи оседают на дно, образуя осадок, и брожение совсем приостанавливается. Вместо сладкого сока получается жидкость, лишенная сахара, но обогащенная спиртом, — это уже вино.

Далее технологический процесс брожения на крупных и мелких винодельческих предприятиях в принци-

пе совпадает. В зависимости от содержания сахара в винограде при брожении получают вина разной крепости, которая исчисляется *в градусах* или *в объемных процентах*. Кроме сахара, виноград содержит кислоты — винную, яблочную, лимонную, без которых он был бы хотя и сладким, но невкусным. Это соотношение между сахарами и кислотами определяет вкус винограда, влияя на оценку вин любого типа — столовых, крепких, шипучих. Когда брожение заканчивается и большинство сахара превращается в алкоголь, чан спускают и стекает первое, наиболее качественное вино — самотек. Оставшееся содержимое чана прессуют, получается первый пресс, содержащий много танинов. Самотек и первый пресс смешивают в определенной пропорции, этот процесс называется купаж, их количественное соотношение зависит от вида получаемого вина. После этого, при производстве дешевого, молодого вина, его переливают в металлические чаны, затем фильтруют и разливают в тару.

При производстве высококачественных белых вин используется только самотек, для других же может применяться и первый и второй пресс. Температуру брожения снижают до 10°C, так как длительное брожение при низкой температуре делает вино более тонким и изысканным.

Дорогое вино выдерживается в погребе, обязательно в дубовых бочках, придающих ему дополнительные ароматы. Осадок, образующийся во время выдержки, постепенно опускается на дно, он состоит из мельчайших фрагментов ягод, мертвых дрожжевых клеток, портящих вкус вина. Для осветления вино «снимают с осадка» четыре раза в год и переливают в чистые бочки. Продолжительность выдержки или созревание длится от одного до двух и более лет, что отражается на качестве. Вина, выдержанные менее года, называют *ординарными*, выдержанные более двух лет — называют *марочными*.

В процессе созревания вино становится стабильным. При этом наряду с дальнейшим накоплением спирта в вине в результате сочетания микробиологических и химических процессов образуются ароматические веществ-

ва (букет вина), оседают дубильные вещества, пектины и винная кислота. Вино со временем созревает. После созревания вино пропускают через механический фильтр и разливают по бутылкам. Как правило, хорошо очищенные вина не способны впоследствии улучшить свое качество, хотя они лучше переносят транспортировку и перемену температур, в то время как слабоосветленные вина легко уязвимы, но хорошо стареют в бутылках, развивая при этом дополнительные ароматы. Это подтверждается осадком винного камня, который присущ дорогим высококачественным винам, требующим декантирования.

В зависимости от используемого сырья, биологических особенностей применяемой расы дрожжей и характера технологического процесса получают различные вина.

В сладких винах содержится некоторое количество несброженного сахара, иногда к таким винам специально добавляют сахар. В сухих винах несброженного сахара мало или совсем нет, так как на вкус он не ощущается.

Если вино разлить по бутылкам до окончания брожения, то продолжающий выделяться  $\text{CO}_2$  оказывается в закупоренных бутылках под значительным давлением, углекислый газ насыщает вино — получаются *игристые вина*, к которым относится шампанское.

Крепость натуральных вин в зависимости от содержания сахара в исходном сырье достигает 9–15 объемных %. Более высокая концентрация спирта подавляет жизнедеятельность самих дрожжей. Концентрация алкоголя, равная 7–8 объемных %, уже является губительной для патогенных микробов, поэтому значение вин в передаче инфекционных заболеваний невелико. Большую опасность в этом отношении представляют слабоалкогольные и безалкогольные напитки.

### **Микроорганизмы — вредители в производстве вина**

Из-за высокого содержания спирта и низкого значения рН (~3) вино является плохим субстратом для роста большинства микроорганизмов, но оно, тем не менее, может портиться под действием микробов. Посторонние микро-

организмы попадают в вино из винограда, плодов и ягод, поверхность которых густо обсеменена, а также с поверхности инвентаря и рук рабочих. К вредителям вина относятся дикие дрожжи, плесневые грибы и бактерии. Все микроорганизмы, инфицирующие вино, можно разделить на две группы: аэробы (плесневые грибы, дрожжи и бактерии) и факультативные анаэробы (в основном бактерии).

### Плесневые грибы

При недостаточной чистоте и наличии влаги развиваются на оборудовании, стенах и полах подвалов, загрязняют воздух производственных помещений, придают вину неприятный запах плесени и изменяют вкус, которые впоследствии трудно устранить.

Наиболее часто в виноделии встречаются грибы родов *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pullularia* (влажные черные слизистые пятна в вине, сусло превращается в слизистую тянущуюся массу), *Botrytis*.

### Дрожжи

Образуют пленки на поверхности вина, придают вину фруктово-эфирный и лекарственный привкусы, вызывают помутнение вина, снижают бродительную активность культурных дрожжей. Это дрожжи родов *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Asatanomyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*.

*Bacterium Acetobacter* — уксуснокислые бактерии, развиваются при доступе воздуха, образуют тонкую пленку на поверхности вина, придают ему резкий запах.

*Lactobacillus* — молочнокислые палочки вызывают появление вкуса и запаха квашеной капусты.

*Micrococcus* — вызывают снижение кислотности, что способствует развитию в вине посторонней микрофлоры, происходит помутнение вина.

## Болезни вин и их возбудители

*Болезнью* называются нежелательные изменения состава вина, вызываемые микроорганизмами-вредителями. Больные вина могут заражать здоровые через технологическое оборудование и коммуникации.

Заболевание вина можно определить по внешним признакам (запаху, вкусу, помутнению), а также по результатам химического анализа и микробиологического исследования. Важным показателем для определения заболевания вина является повышение содержания в нем летучих кислот, наиболее распространенными из которых являются:

1) *цвель вина* (винная плесень) — это заболевание вызывают различные пленчатые дрожжи. Заражению подвергаются столовые виноградные вина с небольшим содержанием спирта при хранении в неполно налитой таре. На поверхности вина в начале болезни образуется тонкая пленка, которая постепенно утолщается и становится морщинистой. Вино под пленкой мутнеет и постепенно превращается в водянистую жидкость с неприятным запахом и вкусом;

2) *уксуснокислое скисание* — возбудителями являются уксуснокислые бактерии, вино приобретает вкус уксусной кислоты и ее эфиров. На поверхности вина образуется тонкая сероватая пленка. Уксусному скисанию подвержены молодые вина с пониженным содержанием спирта и невысокой концентрацией сахара при доступе воздуха;

3) *молочнокислое скисание* — этому заболеванию наиболее подвержены молодые сладкие вина, крепкие десертные вина. Вино приобретает острый сладкокислый вкус и запах квашеной капусты. Повышается титруемая кислотность за счет образования молочной, уксусной и летучих кислот;

4) *ожирение вина* (ослизнение) — при этом заболевании, как правило, поражаются белые вина с невысоким содержанием сахара, спирта, кислот. Вино становится вязким, слизистым, тягучим с неприятным вкусом, аро-

мат вина не изменяется. Возбудителями этой болезни являются бактерии рода *Lactobasillus*, а также бактерии вида *Bactesilem viscosus*.

### **Предупреждение заболеваний вин и борьба с возбудителями**

Главным условием, являющимся надежной гарантией против заболеваний вин, является строгое соблюдение технологического режима, поддержание должного санитарного состояния на предприятиях и систематический микробиологический контроль.

Основными мероприятиями, направленными на предупреждение заболевания вин и борьбы с их возбудителями, служат:

- 1) тщательная сортировка винограда или плодового годного сырья;
- 2) использование чистой тары, очистка ее дезинфицированием и пропариванием;
- 3) сусло перед брожением предварительно окуривают сернистым газом, сульфатируют сернистой кислотой;
- 4) строгий контроль температуры брожения;
- 5) при хранении вин очень важное значение имеет высокая доливка;
- 6) для уничтожения плесени на винзаводе необходимо белить стены и потолки с добавлением 0,5% -ного медного купороса, облицовывать стены кафельной плиткой. Подвалы необходимо окуривать сернистым газом не реже одного раза в неделю;
- 7) поддержание высокого санитарного состояния на производстве: тщательная мойка и дезинфекция оборудования и коммуникаций.

Объектами контроля при микробиологическом исследовании являются сырье (виноград, плоды и ягоды), сусло и мезга, оборудование, разводка чистой культуры дрожжей, бродящее вино, молодое вино, вино на стадии розлива.

Проводят микроскопическое исследование пробы су-сла и мезги, контролируют чистоту культуры дрожжей, бродящее вино на наличие посторонней микрофлоры.

Больными винами считают те, которые заражены бак-териями (более 5 в поле зрения микроскопа и содержащи-ми более 1,5 г/л кислот в белых винах и более 2 г/л кислот в красных винах). Такие вина не подлежат реализации, но после исправления могут быть использованы при купажах вин или для перегонки спирта.

Исправление (лечение) вина целесообразно, когда еще не началось сильное разрушение составных частей вина. Для уничтожения возбудителя порчи применяют один из мето-дов: пастеризацию или вводят антисептики (SO<sub>2</sub>, сорбино-вую кислоту), обработку ультразвуком или УФ-лучами, по-сле чего вино фильтруют. После лечения вина в него вводят танин и подкисляют лимонной кислотой.

### 9.3.3. Микробиологические процессы при приготовлении пищевого уксуса

Получение уксуса известно еще со времен Вавилона. Добавляя уксус в продукты питания, люди длительно сохраняли их, т. е. использовали уксус как первый ан-тибиотик и как обычный напиток для солдат и рабов в Римской империи. В настоящее время его используют как консервант пищевых продуктов в концентрации 0,5–2%, для приготовления приправ, для получения ле-карств и душистых веществ, в химической и текстильной промышленности. Пищевую уксусную кислоту получа-ют уксуснокислым брожением спирта, когда уксусно-кислые бактерии окисляют его в присутствии кислорода до уксусной кислоты. Для промышленных и техниче-ских целей применяют уксусную кислоту, полученную окислением ацетальдегида.

Уксуснокислые бактерии отнесены к роду *Acetobacter*. Типичными представителями являются *A. aceti*, *A. pas-teurianum*. *A. aceti* накапливает в среде до 6% уксусной кислоты, *A. aceti subsp. orleanensis* — до 9,5%. Истори-

ческий интерес представляет *A. aceti*, использованный Пастером для доказательства бактериальной природы процесса образования уксуса.

По морфологии уксуснокислые бактерии представляют собой полиморфные грамтрицательные палочки размером 0,5–8 мкм, не образующие спор. Среди них есть неподвижные и подвижные, с полярно расположенными жгутиками. Они относятся к ацидофильным бактериям, поэтому оптимальное значение кислотности питательного субстрата для них рН 5,4–6,3. Некоторые из них способны синтезировать витамины группы В, однако они сами нуждаются для стимуляции роста в пантотеновой кислоте. Они являются строгими аэробами, оптимальная температура для роста уксуснокислых бактерий около 30°C.

Если жидкость, содержащую хотя бы незначительное количество спирта (пиво, вино), оставить на воздухе, в ней постепенно появляется уксусная кислота, а на поверхности питательного субстрата образуется сухая морщинистая пленка, состоящая из уксуснокислых бактерий. В препаратах, приготовленных из поверхностной пленки, под микроскопом, кроме палочек, видны длинные нити, клеточная оболочка которых обладает способностью к ослизнению. В неблагоприятных условиях уксуснокислые бактерии приобретают необычные формы — появляются длинные толстые нити, иногда раздутые уродливые клетки.

Уксуснокислые бактерии в процессе жизнедеятельности используют в качестве источника энергии спирт и сахаристые вещества субстрата, окисляя их в присутствии кислорода в уксусную кислоту. В промышленности уксуснокислые бактерии применяют для получения различных видов уксуса: *солодового, виноградного, плодово-ягодного, спиртового*. Самые приятные на вкус солодовый и виноградный уксус, но наиболее распространен самый дешевый — спиртовой уксус.

Существует несколько способов получения уксусной кислоты. Процесс ведут в специальных башневидных чанах — генераторах, внутри которых неплотно

закладывают буковую стружку (грабовую, сосновую). В стенках генератора имеются отверстия для вдувания воздуха, чем лучше аэрация, тем активнее протекает процесс брожения. Благодаря адгезивным свойствам уксуснокислых бактерий они плотно заселяют стружки — производственной культурой чаще служит *A. aceti*, окисляющий спирт в уксусную кислоту. Через стружку пропускают уксусноспиртовой субстрат с микроэлементами, к концу технологической линии он превращается в 5–9%-ный раствор уксусной кислоты, который накапливается в нижней части генератора. Полученный пищевой уксус не просто раствор уксусной кислоты, в нем содержатся еще восемь аминокислот, витамины группы В, этанол и еще десятки неидентифицированных компонентов, образованных бактериями.

Уксуснокислые бактерии при нарушении технологического процесса и недостатке спирта могут окислять полученную уксусную кислоту до углекислого газа и воды. Этот процесс называется переокислением и приводит к порче конечного продукта.

Генераторы уксусной кислоты могут работать десятилетиями, но и в уксусном производстве есть свои возбудители порчи. Например, живородящая угрица (длиной около 1 мм), которая питается уксуснокислыми бактериями. Наличие угрицы вызывает помутнение уксуса и придает ему неприятный привкус и запах. Поэтому в конце технологического процесса уксус фильтруют, пастеризуют, разливают в потребительскую тару и отправляют потребителю.

В настоящее время процесс производства уксуса ведут «глубинным» способом в герметично закрытых аппаратах, в которых спиртосодержащий субстрат с введенными в него уксуснокислыми бактериями аэрируется и перемещается непрерывно подаваемым в аппарат воздухом.

Этот метод имеет ряд преимуществ: меньше требуется производственных площадей, процесс автоматизирован и протекает значительно быстрее, а самое главное, исключено попадание из окружающей среды возбудителей порчи уксуснокислого брожения.

## 9.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ КВАШЕНОЙ КАПУСТЫ И ОГУРЦОВ

Термин «квашение» обычно применяют к процессу консервирования капусты. Хорошо известным примером природного молочнокислого брожения, осуществляемого смесью бактерий на общем субстрате, служит сквашивание капусты. Суть приготовления квашеной капусты заключается в том, чтобы создать условия для размножения особых гетероферментативных молочнокислых бактерий, которые сбраживают растительный сахар мальтозу до молочной и уксусной кислот, этанола и углекислоты. При этом происходит снижение рН, появившиеся органические кислоты (молочная, уксусная) консервируют продукт, угнетая постороннюю и гнилостную микрофлору. Самое главное, что органические кислоты, в отличие от процесса маринования, не вносятся в продукт извне, а образуются в самом сырье в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Поэтому весь технологический процесс квашения направлен на создание благоприятных условий для роста и размножения молочнокислых бактерий и брожения растительных сахаров, в результате которого образуется молочная кислота.

Технологический процесс начинается с того, что капусту измельчают до нужных размеров, добавляют морковь (клюкву, тмин, яблоки, хрен и т. д.), вносят 2,2–2,5% поваренной соли, которая способствует выделению сока и еще в начальный период, пока нет молочной кислоты, подавляет рост нежелательной микрофлоры. Капусту плотно укладывают в емкости, поверхность капусты покрывают большими листьями капусты и чистой тканью, кладут гнет-груз для выделения сока и создания анаэробных условий, исключающих размножение аэробных микроорганизмов (гнилостных и плесневых грибов), вызывающих порчу продукта.

Микробиологические процессы в капусте напоминают фазы микробиологических процессов, происходящих при силосовании кормов. Продолжительность фаз

зависит от соблюдения анаэробных условий и влажности субстрата, рН субстрата и температуры окружающей среды.

Во время первой фазы эпифитная микрофлора, состоящая из смеси самых различных бактерий, микроскопических грибов и дрожжей, находившихся на поверхности капусты, начинает бурно размножаться и выделять различные органические кислоты (молочную, уксусную, муравьиную), спирт и  $\text{CO}_2$ . Благодаря выделению углекислого газа измельченной капустой и газов, образующихся при брожении, создаются анаэробные условия, благоприятствующие развитию молочнокислых бактерий. Продолжительность первой фазы обычно кратковременная, она зависит от скорости создания анаэробных условий и появления молочной кислоты.

Во второй фазе, названной фазой главного брожения, происходят самые интенсивные и важные микробиологические процессы. В благоприятных условиях основную роль играют гетероферментативные молочнокислые стрептококки *Leuconostoc mesenteroides*, которые по ферментативной активности опережают другие и ощути-мо подкисляют капусту, этим подавляется рост кишечных и других сопутствующих бактерий. Выделяемая им углекислота вытесняет воздух и усиливает анаэробные условия, что защищает витамин С от окисления. Через 2–3 дня активной ферментативной деятельности лейконосток погибает, так как не выдерживает высокой концентрации им же созданной молочной кислоты. На 4–6 сут на смену лейконостоку приходят другие более выносливые молочнокислые палочки *Lac. plantarum*, *Lac. brevis*, которые образуют ароматические соединения и дополнительное количество кислот (до 1,7%), этиловый спирт, углекислоту, диацетил, ацетальдегид, летучие серные соединения, придающие специфический аромат капусте. Позднее остаются кислотоустойчивые гетероферментативные *Lac. brevis*, которые образуют значительные количества молочной и уксусной кислот,  $\text{CO}_2$  и спирта. В конце этой фазы количество молочнокислых бактерий достигает нескольких миллионов

в 1 г капусты. К этому времени большинство бактерий, не образующих споры, погибает, а спорообразующие сохраняются в виде спор.

В третьей, конечной фазе происходит постепенное отмирание возбудителей молочнокислого брожения. Молочная кислота при определенной концентрации ингибирует и даже губительно действует на молочнокислые бактерии, в капусте остается все меньше живых бактерий, наступает массовая их гибель.

После окончания брожения квашеную капусту следует хранить на холоде, при температуре 0–3°C. При низкой температуре лучше сохраняются аромат и вкус капусты, белый цвет, содержание витамина С.

При нарушении герметичности и доступе воздуха порчу капусты могут вызывать аэробные пленчатые дрожжи и плесени. Они используют молочную кислоту, придают капусте неприятный плесневый запах и горечь. Некоторые дрожжи вызывают ослизнение капусты, под действием особых ферментов плесеней происходит потемнение цвета и размягчение капусты, а также другие побочные процессы.

При нарушении технологического режима (аэробные условия, высокая температура, антисанитарные условия заквашивания и хранения), при снижении кислотности, кроме микроскопических грибов, порчу капусты могут вызывать гниlostные и маслянокислые бактерии, в результате их жизнедеятельности капуста приобретает прогорклый вкус и резкий неприятный запах.

### **Микробиологические процессы при засолке (квашении) огурцов**

При засолке огурцов применяют больше поваренной соли — 6,8–10%, поэтому процесс консервирования называют солением. Квашение огурцов проводят в две стадии. Первая стадия — предварительная, в течение 2–3 дней, для накопления 0,3–0,4% молочной кислоты, проводится при температуре около 20°C, вторая стадия

проводится в условиях холодильника или подвала, при 2–4°C.

Микробиологические процессы при засолке огурцов сходны с процессами, происходящими при квашении капусты, и обнаруживаются такие же виды бактерий. В начальный период развивается смешанная эпифитная микрофлора, по мере нарастания кислотности в результате развития молочнокислых бактерий и наличия поваренной соли, подавляется жизнедеятельность нежелательной микрофлоры. Из молочнокислых бактерий сначала развиваются бактерии рода *Leuconostoc*, которые затем вытесняются более сильными гетероферментативными кислотообразователями *Lac. brevis*, *Lac. fermentum* и гомоферментативными палочками, преимущественно *Lac. plantarum*.

Виды порчи соленых огурцов сходны с порчей квашеной капусты. В основном это ослизнение, размягчение, появление на поверхности пленки молочной плесени или дрожжей, использующих молочную кислоту, что приводит к снижению кислотности продукта и развитию нежелательной микрофлоры. Образование пустот внутри огурцов происходит при нарушении температурного режима хранения или в результате размножения дрожжей, бактерий группы кишечной палочки, интенсивно выделяющих газ.

## 9.5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ХЛЕБОПЕЧЕНИИ

Дрожжи для заквашивания теста впервые были использованы 6 тыс. лет назад, и с того времени этот способ получения дрожжевого теста распространился по западному миру.

Хлеб является одним из основных продуктов питания. Изготовление его представляет собой сложный цикл микробиологических и биохимических процессов, происходящих в тесте с момента смешивания муки

с водой и заканчивая его выпечкой. В состав муки, используемой для выпечки пшеничного и ржаного хлеба, входят компоненты, необходимые для развития многих микроорганизмов. Кроме крахмала, в муке имеется до 2% сбраживаемых сахаров: глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, раффинозы. Мука сильных сортов пшеницы содержит до 14% белка. Азотсодержащие вещества муки представлены разнообразными группами белков — альбуминами, глобулинами и др. Мука содержит до 2% жиров и жироподобных веществ и до 2% минеральных веществ, в том числе микроэлементы.

Решающую роль в приготовлении хлеба наряду с ферментами муки играет жизнедеятельность микроорганизмов. Мука всегда содержит значительное количество различных микроорганизмов, число их зависит от степени загрязненности зерна и способов его очистки. Однако из всего разнообразия микроорганизмов теста наибольшее значение имеют два вида микроорганизмов — дрожжи *Sacch. cerevisiae* и молочнокислые бактерии, для развития которых в тесте есть все необходимые условия — влажность 40–50%, незначительное содержание молекулярного кислорода, наличие легкосбраживаемых углеводов и питательных веществ. Ведущая роль в формировании качества хлеба принадлежит дрожжам, главная функция дрожжей состоит в заквашивании теста, под действием выделяющегося при брожении углекислого газа хлеб становится пористым. Превращение дрожжами углеводов в спирт сопровождается обильным выделением углекислоты и некоторых побочных продуктов, придающих хлебу, изготовленному на дрожжах, только ему присущий вкус, выгодно отличающий его от хлеба, разрыхленного химическим способом (например, при помощи пекарского порошка углекислого аммония, выделяющего при выпечке  $\text{CO}_2$ ). Таким образом, именно микробиологические процессы и продукты бактериального брожения в тесте определяют пористость, окраску и сохранение свежести хлеба, придают ему вкус, аромат и даже повышают его питательную ценность.

Кислотообразующие бактерии разлагают углеводы с образованием главным образом молочной кислоты и некоторых летучих кислот, в частности уксусной. Быстрое развитие молочнокислых бактерий обуславливает начальную кислую реакцию теста, которая задерживает размножение посторонних микроорганизмов и благоприятствует развитию дрожжей. Накопление кислот в пшеничном тесте сравнительно невелико, в ржаном оно значительно, так как ржаное тесто замешивают на закваске, содержащей, кроме дрожжей, и молочнокислые бактерии. В пшеничное тесто вносят только дрожжи, а незначительное количество кислотообразующих бактерий развивается за счет микрофлоры, содержащейся в муке.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* различных рас являются главными разрыхлителями теста. Для хлебопечения особенно важны такие свойства дрожжей, как высокая потенциальная активность гликолитических ферментов, стойкость при хранении, способность переносить высокие концентрации сахаров и поваренной соли окружающей в среде. В хлебопечении чаще всего используют быстрорастущие расы сахаромицетов верхового брожения. У дрожжей полноценных рас подъемная сила, т. е. продолжительность подъема теста на стандартную высоту 70 мм в стандартной форме, должна быть не более 45 мин, а зимазная и мальтазная активности — до 50 и 75 мин соответственно. Зимазная и мальтазная активности выражаются временем, необходимым для выделения 10 мл  $\text{CO}_2$  при сбраживании 20 мл 5% -ного раствора глюкозы дрожжами, которые вносятся в количестве 2,5% к объему среды ( $2 \cdot 10^8$  клеток).

На хлебозаводах применяют прессованные и сухие дрожжи. В течение технологического процесса при приготовлении жидкой закваски из них дополнительно вводят молочнокислые бактерии *Lactobacillus delbrueckii*. Они ускоряют процесс брожения в тесте и обладают высокой протеолитической активностью, которая позволяет накапливать в тесте значительное количество аминного азота, положительно влияющего на скорость роста

и подъемную силу дрожжей. Наряду с сахаромицетами в тесто спонтанно могут попадать нежелательные, «дикие» дрожжи родов *Candida* и *Pichia*.

### 9.5.1. Микроорганизмы, вызывающие болезни хлеба

Болезнями печеного хлеба называют различные изменения в нем, вызываемые деятельностью микроорганизмов, делающих хлеб непригодным к употреблению в пищу или понижающих его качество. Микроорганизмы, содержащиеся в хлебе, попадают в него вместе с мукой, а также из внешней среды, при антисанитарных условиях хранения, при нарушении условий хранения готового хлеба. Химический состав хлеба благоприятен для размножения микроорганизмов (при благоприятной температуре, влажности), поэтому служит хорошим субстратом для развития в нем посторонних микроорганизмов, которые вызывают болезни хлеба.

**Картофельная болезнь.** Болезнь получила свое название от ее возбудителя — так называемой картофельной палочки *Bac. mesentericus*, а также *Bacillus subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. megaterium*. Появляется она на пшеничном хлебе с рН нейтральной средой; ржаной хлеб не подвержен этой болезни благодаря своей высокой кислотности, хотя обычно бывает обсеменен этими бактериями в большой степени. При интенсивном развитии бактерий внешние признаки мякиша изменяются, он издает отвратительный запах, в нем появляется слизистая масса, которая при разломе мякиша растягивается в тонкие нити. Хлеб, пораженный картофельной палочкой, называют тягучим, такой хлеб употреблять в пищу запрещается, он опасен для здоровья и подлежит уничтожению с немедленным изъятием его из магазина.

Мука должна проверяться бактериологическими методами на наличие спор вышеперечисленных бактерий или путем пробной выпечки хлеба, который затем помещают в термостат на 36 ч, затем разрезают и проверяют наличие признаков картофельной болезни.

Методы борьбы с картофельной болезнью хлеба сводятся к поддержанию в помещениях для хранения хлеба температуры не выше 12°C и необходимой влажности, подкислению теста за счет молочнокислого брожения, допускается добавление молочной кислоты 0,2% к весу муки. Заводское помещение должно содержаться в чистоте с регулярным мытьем полов водой с добавлением 1% уксусной кислоты.

**Плесневение хлеба.** Обсеменение поверхности хлеба после его выпечки спорами плесневых грибов происходит главным образом за счет спор, находящихся в воздухе помещения, так как плесень, находившаяся в муке, большей частью погибает при высокой температуре во время выпечки. Большое значение при этом имеет повышенная влажность помещения, где хранится хлеб. В сухом помещении даже при значительном обсеменении спорами развития плесневых грибов на хлебе не происходит. Хорошо пропеченный целый хлеб заражается труднее, чем хлеб, плохо пропеченный, или хлеб с нарушенной коркой, через которую попадают споры плесневых грибов и заражают мякиш.

Чаще всего при температуре до 25°C возбудителями плесневения хлеба являются грибы *Penicillium crustosum* и *Aspergillus glaucus* — образуют налет с желто-зеленым пигментом, *Oospora variabilis* — с белым пигментом, *Rhizopus nigricans* — с серым пигментом. При более высокой температуре возбудителем плесневения хлеба является коричнево-желтая плесень — *Penicillium olivaceum*, черно-коричневая — *Aspergillus niger*, желто-зеленая — *Aspergillus flavus*, белая или кремовая — *Monilia candida*, а также пушистый налет мукооровых плесеней. *Monilia* и *Rhizopus* развиваются на влажном хлебе, а *Aspergillus* хорошо растет и на сухом хлебе при достаточной влажности воздуха.

Эти грибы содержат целый комплекс ферментов, под действием которых изменяется химический состав хлеба, а также ухудшаются его пищевые качества, вкус и аромат. Часто эти грибы являются причиной появления в хлебе неприятного запаха. Хлеб, пораженный плесе-

нью, употреблять в пищу запрещается, не только из-за дурного вкуса и запаха, но и потому что он может явиться причиной заболевания человека микотоксикозом.

«**Красный хлеб**». Возбудителем этого вида заболевания является широко распространенная в природе бактерия под названием «*чудесная палочка*» *Serratia marcescens* (*B. prodigiosum*). Попадая из окружающей среды в хлеб и при благоприятной температуре 20–25°C развиваясь в нем, бактерии образуют на белом фоне пшеничного мякиша сначала розовые, а с усилением процесса — ярко-красные пятна пигмента продигиозина. Бактерии в хлебе вызывают разжижение клейковины и расщепление крахмала. Хлеб, пораженный «чудесной палочкой», употреблять в пищу запрещено.

Меры борьбы с бактериальным заражением сводятся главным образом к поддержанию помещений в чистоте, мойке пола горячей водой с мылом, обработке посуды кипятком. Не образующие спор клетки *S. marcescens* при этом погибают.

**Меловая болезнь**. Внешним признаком болезни является белый порошкообразный налет, который при старении становится похожим на мел. Он образуется на мякише белого и черного хлеба. Налет образуется мицелием дрожжеподобных грибов *Endomyces* и *Monilia*. Они устойчивы к нагреванию и сохраняются при выпечке хлеба. Хлеб, зараженный меловой болезнью, не токсичный, однако, пораженный хлеб теряет товарную ценность.

«**Пьяный хлеб**». Недоброкачественный хлеб, вызывающий после его употребления тошноту, рвоту, головокружение, получил название «пьяный хлеб». В отличие от указанных выше болезней хлеба, «пьяный хлеб» внешне ничем не отличается от доброкачественного. Его вредные свойства обусловлены заражением зерна, из которого приготовлена мука и выпечен хлеб. Поэтому правильнее считать, что это заболевание зерна, а не хлеба. Возбудителем является грибок *Fusarium graminearum*, заражающий зерна пшеницы, ржи, овса, ячменя. Мицелий проникает в ткани зерна, разлагает их с выделени-

ем аммиака и токсических веществ. Для нейтрализации вредных веществ зараженное зерно перед помолом нагревают при температуре 95–100°C. Хлеб, приготовленный из муки, полученной из прогретого зерна, не имеет свойств «пьяного хлеба».

**Спорынья.** Заболевание зерна, известное как спорынья, вызывается грибом *Claviceps purpurea*. Чаще всего спорынья поражает рожь, затем пшеницу и ячмень. Мука, полученная из зараженного зерна, и выпеченный из нее хлеб обладают токсическими свойствами. Алкалоиды поражают центральную нервную систему, вызывая галлюцинации, мышцы конечностей человека, вызывая в тяжелых случаях их омертвление. При обнаружении спорыньи зерно должно быть подвергнуто очистке на специальных машинах.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какую роль выполняют дрожжи в пивоварении?
2. Что такое чистая культура дрожжей?
3. Каковы основные источники инфицирования в пивоварении?
4. Какие бактерии могут развиваться в сусле, пиве и вызывать ухудшение органолептических показателей пива?
5. Как проводится микробиологический контроль в пивоваренном производстве?
6. Какие дрожжи используются в виноделии? Какие требования к ним предъявляются?
7. Какие микроорганизмы являются вредителями вина?
8. Какие болезни вин вам известны?
9. В чем заключается сущность приготовления квашеной капусты, соления огурцов?
10. Чем отличается засолка огурцов от квашения капусты?
11. От чего зависит продолжительность первой, второй и третьей фаз микробиологических процессов при квашении капусты?

## **УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ. ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ, ГРИБКОВЫХ И ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

**В** мире живых систем существуют сложные взаимоотношения между микро- и макроорганизмами, с одной стороны, и условиями внешней среды — с другой. Это результат длительной эволюции и совместного развития органического мира.

Инфекцией называется комплекс биологических процессов в организме животных и человека, возникающий в результате проникновения патогенных микробов в макроорганизм. Взаимоотношения между микро- и макроорганизмом динамичны. Динамику реакций взаимодействия между микро- и макроорганизмами называют инфекционным процессом. Наиболее яркой формой проявления инфекции является инфекционная болезнь, которая характеризуется определенной клинической картиной.

Инфекционный процесс включает в себя следующие периоды:

1) *инкубационный* — определенный промежуток времени с момента проникновения микроба до появления первых клинических признаков болезни;

2) *продромальный* — период предвестников болезни, характеризуется неясными, общими для многих инфекционных болезней симптомами (повышенная температура, отсутствие аппетита, угнетенное состояние);

3) *клинический* — развитие всех свойственных для данной болезни признаков;

4) *исход* — смерть или выздоровление.

В последнем случае в результате переболевания инфекционной болезнью человек или животное приобретают невосприимчивость к этой болезни и в последующем ею не болеют.

Возникновение и развитие инфекции в основном зависит от следующих причин:

- степени патогенности микроба;
- иммунологического состояния макроорганизма;
- условий внешней среды.

*Патогенность микроба* — видовой генетический признак, его потенциальная возможность: вызывать при благоприятных условиях инфекционный процесс.

*Вирулентность* — это степень патогенности конкретного микроба. За единицу вирулентности принята минимальная смертельная доза — *dosis letalis minima* (DLM).

У одного и того же микроба вирулентность может колебаться. Это зависит от ряда биологических, физических и химических факторов, воздействующих на микроорганизм. Вирулентность можно повысить и понизить искусственными приемами.

Ослабление вирулентности происходит под влиянием многочисленных факторов:

- *физических* — длительное выращивание культур на обычных питательных средах при максимальной температуре;

- *химических* — выращивание в питательных средах, содержащих различные антисептические вещества в низких концентрациях;
- *многократное пассирование* культур — через организм мало восприимчивых животных.

Микроорганизмы с пониженной вирулентностью используются для приготовления живых вакцин.

Повышение и усиление вирулентности происходит при многократном пассаже микроба через организм молодых восприимчивых животных.

С факторами, снижающими и усиливающими вирулентность, микроорганизмы постоянно сталкиваются как во внешней среде, так и в организме животных, который для микробов также является внешней средой.

К факторам патогенности микробов относятся:

1) адгезия — способность микроба адсорбироваться (прилипнуть) на чувствительных клетках макроорганизмов;

2) микробные ферменты, деполимеризующие структуры, препятствующие проникновению и распространению возбудителя в макроорганизме;

3) образование капсулы, которая выполняет защитную функцию, повышает резистентность к фагоцитозу и обуславливает вирулентность;

4) токсины — ядовитые вещества, образуемые микробами.

При этом различают: *экзотоксины*, выделяющиеся в окружающую среду в процессе жизнедеятельности, и *эндотоксины*, связанные с телом микробной клетки, поэтому они выделяются в окружающую среду лишь после гибели и разрушения тела микробных клеток.

Таким образом, факторы патогенности микробов ослабляют и приводят основные системы животного организма к дисфункции, в силу чего он погибает. Следует отметить, что не все микробы обладают суммой указанных факторов патогенности: одного-двух из них иногда бывает достаточно, чтобы ослабить реактивность животного и вызвать его гибель.

## **10.1. РОЛЬ МАКРООРГАНИЗМА И УСЛОВИЙ СРЕДЫ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА**

Проникновение возбудителя в организм не всегда приводит к развитию инфекции. Микробы проникают в организм определенными путями, которые называют входными воротами инфекции. Микробы чаще попадают в организм через пищеварительный тракт (с кормом и водой), органы дыхания, поврежденную кожу, слизистые глаз, мочеполовые пути.

В организме микробы встречают множество естественных преград. К ним относятся естественные факторы защиты: анатомо-физиологические (кожа, слизистые оболочки, лимфатические узлы); клеточные (микрофаги-нейтрофилы, макрофаги-моноциты, макрофаги печени, селезенки, лимфатических узлов); гуморальные — нормальные антитела, лизоцим, пропердин, лизины, комплемент, интерферон, ингибиторы и др. Кроме того, ко многим инфекциям животные имеют естественный (конституционный) иммунитет. В возникновении инфекции большое значение имеют возраст животного, качество кормления, зоогигиенические и другие факторы.

Для возникновения инфекции необходимы определенные условия, при которых может происходить взаимодействие между микро- и макроорганизмом (температура, отсутствие различных неблагоприятных факторов и т. д.). Если микроб преодолевает естественные факторы защиты, то происходит начало развития инфекции. В это время включаются специфические факторы защиты организма (гуморальные — специфические антитела, клеточные — Т- и В-лимфоциты). Если у макроорганизма естественные и специфические факторы сильны, то дальнейшее развитие инфекции прекращается и инфекционная болезнь не проявляется.

## 10.2. УЧЕНИЕ ОБ ИММУНИТЕТЕ

Иммунитет (от *лат.* *immunitas* — освобождение, избавление) представляет собой комплекс физиологических приспособлений, которые сохраняют относительное постоянство внутренней среды и предохраняют организм от проникновения в него живых тел и веществ, несущих в себе признаки генетически чужеродной информации.

Начало учению об инфекционном иммунитете положено работами английского врача Э. Дженнера, который впервые (1796) предложил прививки против оспы. В дальнейшем предохранение от инфекционных болезней путем введения прививочного материала получило название «вакцинация» (от *лат.* *vaccas* — корова), а прививочный материал — вакцина. Благодаря работам Луи Пастера с 1881 г. учение об иммунитете получило научное обоснование. Были найдены методы ослабления патогенности возбудителей холеры кур, сибирской язвы, бешенства с целью использования таких культур для приготовления вакцин.

Иммунитет подразделяют на врожденный и приобретенный (рис. 1).



**Рис. 1**  
Классификация иммунитета

Врожденный иммунитет включает видовой, породный и индивидуальный иммунитет. Приобретенный подразделяют на естественный и искусственный. Естественный приобретенный включает активный (постинфекционный) и пассивный (плацентарный, колостральный). Активно приобретенный может быть антимикробным (стерильный и нестерильный) и антитоксическим. Искусственно приобретенный иммунитет может быть *активным* (антимикробный, поствакцинальный и антитоксический) и *пассивным* (сывороточный).

Иммунитет формируется в органах лимфоидной системы, которая называется иммунной системой организма. Лимфоидная система подразделяется на центральную (тимус, костный мозг, фабрициева сумка (у птиц), пейеровы бляшки (у животных)) и периферическую (селезенка, лимфатические узлы, кровь).

Главным компонентом иммунной системы являются лимфоциты. Костный мозг является основным органом гемопоэза, в нем находится самоподдерживающаяся популяция стволовых клеток, из которых в дальнейшем образуются Т- и В-лимфоциты. В тимусе происходит дифференцировка Т-лимфоцитов, ответственных за клеточный иммунитет. Фабрициева сумка (у птиц), пейеровы бляшки (у животных) ответственны за гуморальный иммунитет.

Лимфатические узлы служат как бы фильтрами и участвуют в образовании гуморального и клеточного иммунитета.

Селезенка участвует в основном в иммунных реакциях. Кровь, являясь периферическим органом иммунной системы, представлена отдельными лимфоидными клетками различного назначения и разной степени зрелости, а также гранулоцитами и моноцитами.

Защита организма от инфекции складывается из последовательного включения в борьбу с проникшим возбудителем трех различных эшелонов этой защиты, составляющих в конечном счете функционально единый комплекс факторов естественной резистентности, раннего индукционного ответа и приобретенного иммунного ответа.

Неспецифический противомикробный иммунитет обеспечивают:

- 1) общие физиологические факторы (кожа, слизистые оболочки, секреты);
- 2) гуморальные факторы (лизоцим, пропердин, комплемент, интерферон, ингибиторы);
- 3) клеточные факторы (фагоцитарная активность микро- и макрофагов).

Специфический иммунный ответ у животных осуществляет иммунная система, обладающая уникальной способностью распознавать множество разнообразных микробов, других чужих агентов и молекул, называемых антигенами, и вырабатывать в ответ на их вторжение специфические антитела и сенсibilизированные лимфоциты.

В микробной клетке различают следующие антигены:

- 1) капсульные (К-антиген);
- 2) соматические (О-антиген);
- 3) жгутиковые (Н-антиген).

К специфическим гуморальным факторам относятся антитела — специфические белки (иммуноглобулины), образующиеся в организме определенным типом клеток под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться.

Имуноглобулины (Ig) состоят из четырех полипептидных цепей: двух L-легких и двух H-тяжелых, которые соединены между собой дисульфидными мостиками. По физико-химической структуре, молекулярной массе, функциям, биологическим и другим показателям иммуноглобулины объединены в пять основных классов:

- Ig G является основным классом антител. Их объемом составляет 70%, что превышает содержание других Ig;
- Ig M образуются на ранней стадии развития организма (у плода и новорожденного). Количество их в сыворотке крови человека составляет около 10%;
- Ig A образуются эпителиальными клетками, содержатся в сыворотке крови и серозно-слизистых

секретах, поэтому их называют секреторными. Они составляют до 20% всех Ig;

- Ig D локализуется на стенках кровеносных сосудов и поверхности В-лимфоцитов (концентрация не превышает 1%);
- Ig E образуются в лимфоидной ткани органов дыхания и др., содержание их около 0,1%.

Основное свойство антител — их специфичность, т. е. способность реагировать с тем антигеном, который был причиной их образования. В процессе взаимодействия антитела с антигеном происходит инактивация последнего.

Реакция между антигеном и антителом протекает в две стадии, первая из которых — специфическая (непосредственное соединение активного центра антител с антигенной детерминантой), вторая — неспецифическая, когда иммунный комплекс «антиген — антитело» выпадает в осадок. Если антитела корпускулярные, имеет место феномен агглютинации (склеивания). Когда в реакции участвуют растворимые антигены, наблюдается феномен преципитации (осаждения). Кроме того, антитоксины нейтрализуют токсины, лизины растворяют микробы и эритроциты.

**Иммунопрофилактика и иммунотерапия.** Для иммунопрофилактики используют вакцины (живые, убитые, химические, генно-инженерные, анатоксины). Действующим началом вакцин являются антигены микроорганизмов. После введения вакцин животным иммунитет возникает через 10–14 дней, продолжительность его зависит от вида вакцин — при использовании живых вакцин он длится до одного года и более, после инактивированной — до 6 мес.

Для иммунотерапии применяют иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела. Лечебное действие иммунных сывороток зависит от способа введения. Например, при внутривенном введении действие их происходит в ближайшие часы после введения и продолжается до 2–3 недель, т. е. действие быстрое, но кратковременное. Чем раньше больному введена такая сыворотка, тем выше ее эффективность.

### 10.3. ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ, ГРИБКОВЫХ И ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

#### Возбудитель туберкулеза

Возбудитель — микроорганизм рода *Mycobacterium*, который включает в себя следующие виды: *Myc. tuberculosis* вызывает туберкулез у людей, *Myc. bovis* — у крупного рогатого скота, *Myc. avium* — у птиц.

Туберкулез — хроническое инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое патогенными микобактериями. У животных и человека поражаются главным образом легкие, но могут поражаться и другие органы. Возбудителей туберкулеза человека и крупного рогатого скота открыл Р. Кох в 1882 г., поэтому их иногда называют палочкой Коха.

**Морфология.** Микобактерии туберкулеза — кислото-, спирто- и щелочеустойчивые микроорганизмы, что связано с высоким содержанием липидов. Их типичная форма — стройные или слегка изогнутые палочки, располагаются одиночно или кучками, неподвижны, спор и капсул не образуют, с трудом окрашиваются по Граму положительно. Размеры клеток могут значительно варьировать: длина от 1,5 до 4 мкм.

Для их выявления применяют специальный метод окрашивания по Цилю — Нильсену, основанный на том, что применяют концентрированный основной фуксин Циля при подогревании. Микобактерии хорошо прокрашиваются и при кратковременном обесцвечивании серной кислотой удерживают красный цвет, посторонняя микрофлора успевает обесцветиться, поэтому ее в дальнейшем дополнительно окрашивают метиленовой синью, что позволяет ее дифференцировать.

**Культивирование.** Следует отметить, что микобактерии туберкулеза строгие аэробы, на обычных средах не растут, применяют специальные глицеринсодержащие

или яичные среды (Петраньяни, Гельберга и др.). Культивируют при температуре 37–39°C, растут медленно, видимые колонии проявляются через 7–30 дней и более. На глицериновом бульоне образуют поверхностную пленку, на плотных средах образуют R- или S-формы колонии в зависимости от вида возбудителя.

**Устойчивость.** Микобактерии туберкулеза обладают значительной устойчивостью к химическим и физическим воздействиям, особенно к высушиванию. В высушенной мокроте, кусочках пораженной ткани, пыли микобактерии жизнестойки от 2 до 7 мес. и более. В воде микроб выживает 5 мес., в почве — 7 мес., при гниении материала — 76–167 дней и дольше. Холод не влияет на жизнеспособность микобактерий.

Микобактерии весьма чувствительны к воздействию прямых солнечных лучей, в жаркие дни, в мокроте они погибают через 1,5–2 ч. Во влажной среде микобактерии гибнут при 60°C в течение 1 ч, при 65°C — через 15 мин, при 70–80°C — через 5–10 мин. В масле микобактерии сохраняются неделями, а в некоторых сырах — даже месяцами. Микобактерии туберкулеза по сравнению с другими неспорообразующими бактериями значительно более устойчивы к химическим дезинфицирующим веществам, 5%-ный раствор фенола и 10%-ный раствор лизола разрушают возбудителя через 24 ч, 4%-ный формалин — после 12 ч.

**Лабораторная диагностика.** Для исследования при寄лают: пораженные органы и ткань, кровь, гной, молоко и т. д. Бактериологическая диагностика проводится по следующей схеме:

1) приготовление препаратов из исследуемого материала, окраска по Цилю — Нильсену, микроскопия;

2) для выделения чистой культуры делают посев на среды Петраньяни, Гельберга, перед посевом исследуемый материал обрабатывают 6–10%-ным раствором серной кислоты для освобождения от сопутствующей микрофлоры;

3) заражение восприимчивых лабораторных животных.

**Аллергическая диагностика туберкулеза.** В практике ведущее значение для прижизненного распознавания туберкулеза у животных и птиц имеет аллергическая диагностика при помощи туберкулина (Кох, 1890). В настоящее время основным методом проверки животных на туберкулез является внутрикожная туберкулиновая проба.

**Иммунитет и средства специфической профилактики.** При туберкулезе он нестерильный, длящийся до тех пор, пока в организме находятся живые микобактерии туберкулеза. Живую вакцину против туберкулеза (БЦЖ) предложили в 1924 г. французские ученые Кальметт и Герен.

### **Возбудитель сибирской язвы**

**Возбудитель.** *Bacillus anthracis* (Кох, 1872) — типичный представитель патогенных бацилл. Относится к семейству *Bacillaceae* и роду *Bacillus*. Этот микроб часто называют бациллой антракса.

Сибирская язва (*anthrax*) — зооантропоноз. К ней восприимчивы животные многих видов, особенно травоядные, и человек. Инфекционный процесс протекает преимущественно остро с явлениями септицемии или с образованием различной величины карбункулов. Болезнь регистрируют в виде спорадических случаев, возможны энзоотии и даже эпизоотии. Название болезни (сибирская язва) предложил в 1789 г. С. С. Андриевский, который изучал ее на Урале и в Сибири.

**Морфология.** Бацилла антракса довольно крупная (3–10 мкм) палочка, грамположительная, неподвижная, образующая капсулу и споры. Микроб встречается в трех формах: в виде вегетативных различной величины клеток (капсульных и бескапсульных), в виде спор, заключенных в хорошо выраженный экзоспориум, и в виде изолированных спор.

**Культивирование.** Сибиреязвенный микроб по способу дыхания относят к факультативным аэробам. Бацилл

ла антракса нетребовательна к питательным средам. На МПА образует очень характерные колонии R-формы, в МПБ — на дне появляется осадок, надосадочная жидкость остается прозрачной.

**Устойчивость.** Устойчивость и длительность выживания у вегетативных клеток и спор возбудителя сибирской язвы различны. Первые относительно лабильны, вторые устойчивы и могут сохраняться неопределенно много лет.

**Лабораторная диагностика.** При подозрении на сибирскую язву категорически запрещается вскрывать трупы павших животных. Для лабораторного исследования на сибирскую язву чаще всего направляют ухо павшего животного. При вынужденном забое или подозрении на сибирскую язву во время вскрытия осторожно отбирают кусочки селезенки, печени, измененные лимфоузлы. Исследуют также пробы почвы, фуража, воды и кожевенно-мехового сырья; объектами для серологического исследования в реакции преципитации служат пробы кожевенно-мехового сырья и разложившиеся ткани.

Исследование проводят по схеме: микроскопия мазков, выделение и изучение свойств чистой культуры, биопроба на лабораторных животных, при необходимости применяют серологические исследования — реакцию преципитации.

**Иммунитет и средства специфической профилактики.** В результате естественного заражения и переболевания сибирской язвой у животных возникает длительный иммунитет.

Активная защита животных от сибирской язвы путем вакцинации — надежное средство профилактики данного заболевания. С этой целью применяют живые споровые сибиреязвенные вакцины из штамма № 55. Вакцину вводят однократно, иммунитет наступает через 10 дней и продолжается не менее года.

Для лечения и пассивной профилактики применяют антибиотики, противосибиреязвенную сыворотку и гамма-глобулин. Пассивный иммунитет наступает через несколько часов и сохраняется до 14 дней.

## Возбудитель колибактериоза

**Возбудитель.** *Escherichia coli*. Впервые ее выделил в 1885 г. Т. Эшерих из фекалий больного ребенка. Колибактериоз — остропротекающая инфекционная болезнь молодняка сельскохозяйственных животных, включая птиц и пушных зверей. Возбудитель болезни — патогенные серологические варианты *E. coli*. Впервые ее выделили в 1885 г.

**Морфология.** *E. coli* — полиморфные палочки с закругленными концами, длиной 1–3 и шириной 0,3–0,6 мкм. Располагаются одиночно, по Граму красятся отрицательно, спор не образуют, подвижные (перетрихи), но встречаются и неподвижные.

**Культуральные свойства.** *E. coli* аэроб или факультативный анаэроб, оптимальная температура роста 37–38°C, рН среды 7–7,4. Хорошо растет на обычных питательных средах — МПА, МПБ. На МПА через 24 ч появляются сочные, круглые, с ровными краями (S-форма), серо-белого цвета колонии. В МПБ — интенсивное помутнение среды и наличие незначительного осадка, легко разбивающегося при встряхивании.

**Устойчивость.** Эшерихии устойчивы к воздействию факторов внешней среды. В почве они сохраняют жизнедеятельность от 6 до 11 мес., в навозе — до 11 мес., в воде — до 300 дней. При нагревании среды до 60°C погибают в течение 10 мин, при 100°C — моментально. Губительно действуют многие дезинфицирующие растворы: 2%-ный раствор активного хлора; 2,5%-ный раствор формальдегида, 2%-ный раствор гидроокиси натрия, 3%-ный раствор однохлористого йода.

**Лабораторная диагностика.** Для бактериологического исследования в лабораторию направляют свежий труп, паренхиматозные органы, трубчатую кость и т. д. Бактериологический диагноз на колибактериоз у млекопитающих считают установленным при выделении культур эшерихий из селезенки, костного или головного мозга, при выделении культуры не менее чем из двух органов больного животного кишечной палочки, патогенной для белых мышей.

**Иммунитет и средства специфической профилактики.** С целью создания колострального иммунитета вакцинируют стельных коров, супоросных свиноматок, суягных овец. Вакцину вводят согласно наставлению за 1–2 мес. до отела, опроса, окота.

Для профилактики и терапии колибактериоза используют поливалентную иммунную сыворотку согласно наставлению. С целью профилактики применяют бактериофаг паратифа и колибактериоза с питьем по определенной схеме в течение нескольких дней. Из средств активной терапии используют антибиотики с учетом чувствительности к ним эшерихий.

### **Возбудитель сальмонеллеза**

**Возбудитель.** В настоящее время известно более 2 тыс. серовариантов сальмонелл, объединенных в один род — *Salmonella*. Род включен в семейство *Enterobacteriaceae*.

Сальмонеллезы — группа инфекционных болезней преимущественно молодняка сельскохозяйственных и промысловых животных (телят, поросят, жеребят, ягнят, пушных зверей, птиц).

**Морфология.** Сальмонеллы — мелкие палочки с закругленными концами от 1 до 4 мкм длины, в мазках располагаются одиночно, беспорядочно, подвижны (за исключением *S. pullorum-gallinarum*), спор и капсул не образуют, по Граму красятся отрицательно.

**Культуральные свойства.** Сальмонеллы — аэробы и факультативные анаэробы, оптимальная температура роста 37°C, рН среды 7–7,2. Хорошо растут на обычных питательных средах: МПА — образуют мелкие серо-белые колонии S-формы, на МПБ — обильное помутнение, на дне осадок.

**Устойчивость.** Сальмонеллы устойчивы к воздействию факторов внешней среды. При температуре 60°C погибают в течение 1 ч, при 100°C — моментально. В почве и других объектах внешней среды сохраняются от 30 до 270 дней, в трупах — до 100 дней, в открытых водоемах

и питьевой воде — от 11 до 120 дней, в замороженном мясе — от 6 до 13 мес., в колбасных изделиях — от 60 до 130 дней, в яйцах — до 13 мес., в яичном порошке — до 9 мес., на замороженных овощах и фруктах — от 2 недель до 2,5 мес.

**Лабораторная диагностика.** Посмертно в лабораторию направляют свежий труп мелких животных, в том числе птиц, от трупов крупных животных — паренхиматозные органы. Из органов готовят препараты на предметном стекле, окрашивают по Граму, под микроскопом изучают морфологические признаки.

Для выделения чистой культуры исследуемый материал засевают в пробирки с МПБ и МПА, для дифференциации от кишечной палочки делают посев в чашки Петри с агаром Эндо и Левина, на которых сальмонеллы образуют неокрашенные колонии; на висмут-сульфитном агаре — колонии черного цвета с металлическим блеском.

**Иммунитет и средства специфической профилактики.** После переболевания у животных формируется напряженный и длительный иммунитет. В неблагополучных хозяйствах молодняк вакцинируют убитой формолвакциной. Только для поросят применяют сухую живую вакцину из аттенуированного штамма ТС-177.

## **Возбудитель бруцеллеза**

**Возбудитель.** Бруцеллы включены в род *Brucella*, в который входят: *B. abortus* — возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота; *B. melitensis* — овец и коз; *B. suis* — свиней.

Бруцеллы являются возбудителями бруцеллеза — хронической инфекционной болезни животных и человека, проявляющейся абортами, эндометритами, задержанием последа, у лошадей — преимущественно бурситами в области холки и воспалением связок затылочного сустава. *B. ovis* — вызывает у овец аборт и рождение нежизнеспособных ягнят.

Человек болеет при непосредственном контакте с больными животными, а также при употреблении в пищу зараженных продуктов — молока и мяса. Заболеваемость людей бруцеллезом носит прежде всего профессиональный характер. Возбудитель проникает в организм человека через кожу, слизистую оболочку дыхательных путей и желудочно-кишечный тракт при оказании помощи больным животным. В странах, где отсутствует массовая пастеризация молока, бруцеллез более распространен. Большинство случаев заражения бруцеллезом связано с употреблением в пищу сыра и молока от больных животных.

**Морфология.** Бруцеллы — мелкие коккобактерии (0,3–0,6 мкм) или палочки (0,6–2,5 мкм), в препаратах располагаются одиночно, парами и небольшими группами. Неподвижные, по Граму красятся отрицательно, спор не образуют.

**Культивирование.** Для культивирования бруцелл используют специальные среды: мясопептонный печеночный бульон (МППБ), мясопептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГТА), печеночно-глюкозно-глицериновый бульон и агар (ПГТБ, ПГТА) с 1% глюкозы и 2–3% глицерина. Оптимальная температура для культивирования бруцелл 36–38°C и рН 6,8–7,2.

**Устойчивость.** Бруцеллы малоустойчивы к действию различных физических и химических факторов.

**Иммунитет и средства специфической профилактики.** Для специфической профилактики бруцеллеза были предложены живые и убитые вакцины. Применяется живая вакцина из штамма № 19 *Br. abortus*.

У нас в стране, кроме указанной вакцины, в производственных условиях широко применяют против бруцеллеза крупного рогатого скота сухую живую вакцину из слабоагглютиногенного штамма № 82 *Br. abortus*. Против бруцеллеза мелкого рогатого скота — сухую живую вакцину, приготовленную из культуры *B. melitensis* штамма Рев-1.

Профилактика заболеваний человека определяется эффективностью профилактики бруцеллеза среди жи-

вотных. Снижению заболеваемости способствует элементарное соблюдение правил личной гигиены и режима обработки сельскохозяйственной продукции, например обязательной пастеризации молочных продуктов.

### 10.3.1. Микроорганизмы — возбудители дерматомикозов

#### Возбудители трихофитии

**Возбудитель.** Трихофития — *Trichophytia* (стригущий лишай) — заразная болезнь, характеризующаяся появлением на коже резко ограниченных безволосых очагов с шелушащейся отрубевидной поверхностью или с выраженной воспалительной реакцией кожи и фолликулов.

Трихофитию у животных вызывают грибы, относящиеся к роду *Trichophyton*. У крупного рогатого скота трихофитию вызывают *Tr. faviforme* и *Tr. tonsurans*. В нашей стране крупный рогатый скот чаще всего поражает гриб *Tr. verrucosum*.

**Культивирование** осуществляют на глюкозном агаре, среде Сабуро или сусло-агаре с оптимальным для них рН 6,5–6,8, при температуре 26–28°C.

**Устойчивость.** Находясь под защитой роговых масс волоса, возбудители трихофитии сохраняют вирулентность до 4–7 лет, а споры — до 12. При температуре 62°C гриб погибает в течение 2 ч, а при 100°C в течение 15–20 мин.

При воздействии щелочного раствора формальдегида в соотношении 1:2, горячего 10% -ного раствора сернокарболовой смеси при двукратном нанесении грибы погибают в течение 1 ч.

Диагноз ставят на основании характерных клинических признаков и эпизоотологических данных. В сомнительных случаях проводят микроскопические исследования соскобов кожи и волос из пораженных участков.

**Иммунитет и средства специфической профилактики.** Животные, переболевшие трихофитией в первый год жизни, повторно не болеют. Зарегистрированы отдельные случаи естественной невосприимчивости животных, как к трихофитии, так и к микроспории.

Для специфической профилактики трихофитии в неблагополучных хозяйствах используют вакцины ЛТФ-130. Телятам их вводят в область крупа двукратно с интервалом 10–14 дней в дозах 5, 8, 10 мл, в зависимости от возраста. Через месяц у животных формируется иммунитет длительностью не менее четырех лет.

### **Возбудители микроспории**

**Возбудитель.** *Microsporiasis* (микроспороз или стригущий лишай) — заразная болезнь кожи и волос, клинически характеризующаяся образованием очагов поверхностного воспаления кожи, обламыванием волос и поражением ногтей. Возбудители микроспории — грибы из рода *Microsporum*.

**Устойчивость.** Споры гриба в пораженных волосах, кожных соскобах способны сохраняться до 2–5 лет. В сухожаровых камерах при температуре 140°C гриб погибает за 30 мин, при 80°C — за 2 ч, при кипячении — за 2–3 мин. Под действием 3% -ного раствора формальдегида и 5–8% -ных растворов гидроокиси натрия грибы погибают в течение 20–30 мин.

Диагноз ставят на основании характерных клинических признаков и эпизоотологических данных. В сомнительных случаях проводят микроскопические исследования соскобов кожи и волос из пораженных участков. С целью дифференциации грибов рода *Microsporon* от *Trichophyton* у кошек и собак используют люминесцентный метод. Исследуемый материал рассматривают под ультрафиолетовыми лучами на расстоянии 20 см в затемненной комнате. Пораженные возбудителем микроспории волосы дают яркое зеленоватое свечение, споры трихофитии не светятся.

Для специфической профилактики применяют вакцину Ментавак. С лечебной целью используют мазь юглол или 2% -ную мазь перихотецина на рыбьем жире, препарат РОСК. На протяжении 2–3 недель с кормом задают гризеофульвин из расчета 25–30 мг на 1 кг живой массы.

### 10.3.2. Возбудители микотоксикозов

Микотоксикозы — кормовые отравления, возникающие у сельскохозяйственных животных после скармливания им кормов, загрязненных токсинами, вырабатываемыми микроскопическими грибами. Восприимчивы все виды животных. Клинические признаки разнообразны: расстройство желудочно-кишечного тракта, поражение нервной системы, дистрофия печени. Название болезни зависит от родового названия микроскопического гриба, вызвавшего кормовое отравление: аспергиллотоксикоз (*Aspergillus*), стахиботриотоксикоз (*Stachybotrys*), фузариотоксикоз (*Fusarium*).

**Схема лабораторной диагностики.** В лабораторию посылают исследуемые корма с признаками плесневого поражения (солома, сено, зернофураж), пораженные участки кишечника, паренхиматозные органы. В сопроводительном документе указывают цель исследования, вид корма, место отбора пробы, основные клинические признаки у больных животных.

Схема лабораторной диагностики для всех возбудителей микотоксикозов одинаковая. Одновременно и параллельно проводят:

- микологическое исследование, основная цель которого — выделение чистой культуры микроскопического гриба и определение вида;
- токсикобиологическое исследование корма, основная цель которого — определение токсичности корма и чистой культуры микроскопического гриба.

**Микологическое исследование.** Для выделения чистой культуры из исследуемого корма делают посев в чашки Петри с агаром Чапека или сусло-агаром, содержащих ингибиторы-антибиотики для подавления сопутствующей микрофлоры. Исследуемое зерно, кусочки кормов раскладывают на питательной среде по часовой стрелке, культивируют при комнатной температуре 3–10 дней, по мере появления колоний приступают к определению вида гриба. Учитывают культуральные свойства: характер роста, форму и величину колоний, наличие пигмента.

### 10.3.3. Микроорганизмы — возбудители вирусных инфекций

#### Вирус бешенства

**Возбудитель.** Вирус бешенства вызывает остро протекающую болезнь теплокровных животных, характеризующуюся поражением ЦНС. Восприимчивы домашние и дикие животные всех видов и человек.

Вирус относится к семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*, имеет пулевидную форму, длина — 180 нм, содержит РНК, количество капсомеров 1200–1700, спиральный тип укладки, имеет наружную оболочку с булабовидными выпячиваниями, является чувствительным к эфиру, хлороформу, фенолу и формалину, репродукция происходит в цитоплазме нервных клеток.

**Устойчивость.** Низкие температуры консервируют вирус, высокие — инактивируют. Вирус быстро инактивируется при воздействии обычно используемых дезинфицирующих растворов лизола, щелочей, формалина, хлорамина. Наилучшим консервантом вируса является 50% -ный глицерин.

**Культивирование.** Вирус бешенства хорошо культивируется на естественно восприимчивых животных, бе-

лых мышах, кроликах, развивающихся куриных эмбрионах и культурах клеток.

**Клинические признаки.** Инкубационный период при бешенстве может варьировать в пределах от нескольких дней до года и более, но чаще всего составляет 3–6 недель. Его продолжительность зависит от места и силы укусов, количества и вирулентности внесенного в рану вируса, степени устойчивости покусанного животного или человека. Срок инкубации у молодняка короче, чем у взрослых животных.

Для бешенства характерно острое течение. Клинические признаки в принципе сходны у животных всех видов, но лучше изучены у собак. Они у них обычно проявляются в буйной или тихой форме, очень редко в атипичной форме.

**Методы диагностики.** Предположительный диагноз на бешенство ставят на основании эпизоотологических данных и клинических признаков болезни. Окончательный диагноз ставят на основании результатов лабораторных исследований (обнаружение телец Бабеша — Негри в мозговой ткани, выделения вируса из исследуемого материала).

**Лечение** больных животных не проводят. Заболевших животных немедленно убивают, так как их перевозка связана с риском заражения людей.

**Профилактика.** В настоящее время для специфической профилактики бешенства применяют инактивированные вакцины.

## **Вирус гриппа**

Все вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae* и включают три рода — род вирусов гриппа А, В и С. Эти вирусы относятся к РНК-содержащим.

**Устойчивость.** Вирусы гриппа устойчивы к эфиру, хлороформу, термолабильны, чувствительны к кислотам, протеолитическим и липолитическим ферментам. Растворы хлорамина, хлорной извести, формалина,

карболовой кислоты в принятых для дезинфекции концентрациях инактивируют возбудитель за 5–10 мин.

**Культивирование.** Культивирование вирусов гриппа хорошо удается в организмах белых мышей, хомяков и хорьков при интраназальном заражении, на куриных эмбрионах при заражении их в аллантаоисную или амниотическую полости и в культурах клеток почек белых мышей, хомяков, поросят, телят и человека.

**Клинические признаки.** Инкубационный период при гриппе длится от 1 до 7 дней. На степень проявления клинических признаков заболевания большое влияние оказывают условия содержания, индивидуальная резистентность животных. При типичном проявлении гриппа повышается температура. Слизистые оболочки глаз набухшие, отечные, из угла глаз выделяется серозно-катаральный экссудат, животные кашляют, чихают и т. д. Возможно поражение желудочно-кишечного тракта (поносы), развитие плевропневмонии. Гибель взрослых животных не превышает 2–4%, но молодняка (поросят) достигает 70%, а птиц до 100%.

**Методы диагностики.** Предварительный диагноз на грипп ставят на основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных. Для окончательного диагноза необходимо провести лабораторные исследования (РИФ, РГА, выделение вируса и его идентификация).

**Иммунитет.** Приобретенный в естественных условиях иммунитет высоко штаммоспецифичен, длительность и напряженность его у животных и птиц недостаточно изучены. Для специфической профилактики гриппа животных и птиц применяются живые и инактивированные вакцины.

## **Вирус ящура**

**Возбудитель.** Вирус ящура относится к семейству *Picornaviridae*, роду афтовирис. Вирионы ящура относятся к РНК вирусам. Размер вирионов около 20 нм.

**Устойчивость.** Вирус ящура сравнительно устойчив к факторам внешней среды. Не чувствителен к эфиру. В стенках афт он сохраняет вирулентность 67 дней, в навозной жиже — 39, в сточных водах до 103 дней. Лучшие дезинфицирующие средства — 2–3%-ные горячие растворы NaOH и 1%-ный раствор формальдегида.

**Методы культивирования.** Вирус культивируется на естественно восприимчивых и лабораторных животных: новорожденных мышатах и крольчатах, морских свинках, хомяках 60-дневного возраста. Хорошо репродуцируется в культуре клеток почек чувствительных животных, некоторых перевиваемых линиях клеток (ВНК-21, СПЭВ и др.) с выраженным ЦПД.

**Клинические признаки и патологоанатомические изменения.** Инкубационный период продолжается 1–3 дня, иногда до 7–10 дней. Самый характерный признак данного заболевания у животных — везикулярное поражение слизистых оболочек рта и кожи венчика и вымени. Через сутки афты разрываються и образуются эрозии. У молодняка ящур обычно протекает злокачественно (гибель 80% и более).

**Диагностика** болезни осуществляется прежде всего на основании эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений. Лабораторные методы диагностики используются для уточнения поставленного диагноза и определения типов и вариантов (выделение вируса и идентификация его в РСК).

**Иммунитет.** Продолжительность иммунитета у животных, переболевших ящуром, составляет 8–12 мес., у свиней — 10–12, у овец — 18 мес. При ящуре возникает тканевой и гуморальный иммунитет.

**Специфическая терапия и профилактика.** Для лечения ящура используют сыворотку (кровь) реконвалесценто́в. Для специфической профилактики ящура у крупного рогатого скота и овец стали также использовать бивалентную вакцину из культурального вируса. Сконструированы генно-инженерные и синтетические вакцины.

#### **10.4. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ (ЛЕЧЕБНО- ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ, ПРОБИОТИКИ, ФЕРМЕНТЫ, АНТИБИОТИКИ)**

*Вакцины* — это биологические препараты, содержащие микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, которые применяют для активной иммунизации с целью создания иммунитета (невосприимчивости) организма к определенным инфекционным болезням. Различают вакцины живые и инактивированные (корпускулярные), а также химические и анатоксины (некорпускулярные).

Живые вакцины представляют собой взвесь бактерий, приготовленных из аттенуированных возбудителей, ослабленных ультрафиолетовыми лучами, длительным выращиванием на искусственных питательных средах, иногда в присутствии ингибитора и т. д. В результате целенаправленного воздействия микроорганизмы, потеряв вирулентность, должны сохранить антигенные и иммуногенные свойства.

Убитые вакцины обычно готовят из взвеси вирулентных и иммуногенных штаммов бактерий, поэтому в процессе приготовления вакцин их инактивируют. Для инактивирования бактерий используют высокую температуру или химические вещества, в основном применяют формалин, добавляя от 0,2 до 0,5%, в зависимости от биологических особенностей микроорганизмов.

Вначале выращивание бактериальной массы для живой и убитой вакцины проводят в жидкой обогащенной питательной среде в котлах-реакторах, аэрируемых подаваемым кислородом. После накопления максимальной концентрации бактериальная масса отделяется от жидкой части путем центрифугирования. Полученная бактериальная масса служит основой для получения

вакцин. Концентрацию бактерий в 1 мл готовой вакцины доводят до 4 млрд в 1 мл при помощи стандартного эталона мутности, фотометрически подогнанного к мутности определенной концентрации бактерий.

Для усиления процессов иммуногенеза в вакцины в процессе изготовления стерильно добавляют адъюванты. Это различные химические вещества органической и неорганической природы: гидроокись алюминия, алюмокалиевые квасцы, ланолин, сапонин. Адъюванты усиливают гуморальный иммунитет и клеточный иммунный ответ на введенный антиген.

Приготовленную вакцину проверяют на стерильность, безвредность и активность (иммуногенность). Все инактивированные препараты должны быть стерильными. Для контроля на стерильность из препарата делают высеv на МПА, МПБ, МППБ и среды для выявления микроскопических грибов. При высеvе из живой вакцины должна вырасти только одна культура, указанная на этикетке.

Важнейшим элементом контроля на безвредность является проверка качества вакцины на лабораторных животных. Обычно используют от 3 до 5 животных на каждую серию изготовленной партии. Вакцина безвредна, если у привитых животных она не вызывает никаких патологических симптомов. Активность (иммуногенность) определяют следующим методом: животных иммунизируют проверяемой вакциной, через две недели иммунизированным и контрольным животным вводят смертельную дозу культуры микробов, за ними наблюдают в течение определенного времени. Иммунизированные животные должны остаться живыми и здоровыми, а контрольные — погибнуть.

**Химические вакцины** представляют собой антигенные комплексы, извлеченные из микробной клетки и очищенные от балластных иммунизирующих веществ.

**Анатоксины** — это экзотоксин, утративший свою токсичность, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства. Широко применяемыми анатоксинами являются вакцины против столбняка и ботулизма.

При приготовлении столбнячного анатоксина к фильтрату токсинсодержащей бульонной культуры добавляют 0,5% формалина, инактивируют при 39°C в течение 30 сут, затем концентрируют удалением 80% надосадочной жидкости и добавляют алюмокалиевые квасцы. Контроль качества биопрепарата проводят по обычным параметрам.

Все флаконы с биопрепаратами должны быть опечатаны и снабжены этикетками, на которых указывают наименование препарата, биофабрику, дату выпуска, срок годности, серию, номер госконтроля, дозировку.

**Иммунные сыворотки и иммуноглобулины** выпускаются предприятиями биологической промышленности. В качестве продуцентов иммунных сывороток используют лошадей, мулов, ослов, волов и реже другие виды животных. Гипериммунизацию проводят нарастающими дозами антигенов по утвержденным производственным схемам, отличающимся продолжительностью иммунизации, интервалами между циклами иммунизации, дозами для каждого цикла введения антигена и реакцией продуцента.

После окончания цикла иммунизации, когда в сыворотке крови животных-продуцентов находится максимальное количество специфических антител, у животных частично или тотально берут кровь. Кровь помещают в термостат для свертывания, при этом отделяется прозрачная сыворотка, ее отсасывают и стерилизуют, пропуская через бактериальные фильтры. Сыворотку консервируют, добавляя 0,25–0,5% фенола, разливают во флаконы с этикеткой.

Гипериммунные сыворотки применяют для лечебных и профилактических целей, они создают лишь кратковременный пассивный иммунитет. Иммунитет после введения сыворотки наступает в ближайшие часы, но не превышает 2–3 недели.

Безвредность каждой серии сывороточных препаратов проверяют на лабораторных животных, которым подкожно вводят 10 мл сыворотки. Животные должны оставаться здоровыми, без выраженных проявлений местной и общей реакции.

Специфическую активность сывороточных препаратов определяют с помощью реакции биологической нейтрализации: чем меньше доза сыворотки, способная нейтрализовать действие определенной дозы токсина, тем выше ее активность.

Контроль бактериальной чистоты сывороточных препаратов проводят по общепринятой методике посевами из препарата на специальные питательные среды (МПА, МПБ, МППБ и на агар Сабуро).

**Диагностические антительные диагностикумы** выпускают предприятия биологической промышленности. Получают путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном-возбудителем. Чаще продуцентами сывороток являются лабораторные животные (кролики), которые во время гипериммунизации активнее вырабатывают антитела в высоком титре. Технологический процесс гипериммунизации, методика отделения сыворотки, контроль специфической активности антительного диагностикума в принципе тот же, что и при получении лечебной иммунной сыворотки. Антительные диагностикумы применяют как известный компонент в серологических реакциях при определении вида возбудителя, выделенного из исследуемого материала.

**Диагностические антигенные диагностикумы** готовят на предприятиях биологической промышленности по принципу приготовления инактивированных вакцин. Например, приготовление бруцеллезного антигенного диагностикума проводят по следующей методике: на обогащенном печеночном агаре выращивают бруцеллезную биомассу из вакцинного штамма № 19, инактивируют нагреванием, устанавливают концентрацию 10 млрд микробных тел в 1 мл, консервируют фенолом, разливают во флаконы с этикеткой.

Сальмонеллезный антигенный диагностикум представляет собой взвесь из 10 млрд сальмонелл, применяют при серологической диагностике сальмонеллеза.

Стандартный сибиреязвенный антиген для РП представляет собой прозрачный экстракт из убитых нагреванием бацилл вирулентного штамма сибирской язвы,

применяют для контроля качества компонентов при постановке РП при исследовании кожевенного сырья, мяса на сибирскую язву.

**Аллергены** — выпускают предприятия биологической промышленности. Представляют собой экстракты из бактериальной массы, не должны обладать антигенными свойствами. Аллергены применяют для аллергической диагностики туберкулеза (туберкулин), бруцеллеза (бруцеллин), сибирской язвы (антраксин) и др.

Туберкулин готовят путем выращивания культур микобактерий туберкулеза человеческого вида на мясопептонном глицериновом бульоне в течение 6–8 недель. Затем культуру автоклавируют, выпаривают до 1/10 объема, фильтруют через бактериальные фильтры Зейтца и добавляют 50% глицерина от общего объема. Контроль качества аллергена включает в себя установление стерильности и специфической активности. Специфическую активность проверяют на здоровых и реагирующих на аллерген животных параллельно со стандартным аллергеном.

#### **10.4.1. Технология производства пробиотиков**

Одним из перспективных направлений разработки новых биопрепаратов является создание пробиотиков на основе микроорганизмов с заданными свойствами, полученными методами генной инженерии. Создание пробиотиков и их широкое применение являются сегодня стратегическим направлением в борьбе со многими инфекционными заболеваниями человека и животных.

На фоне высокой обсемененности кормов и различных объектов внешней среды условно-патогенными микроорганизмами происходит опережающее заселение кишечника новорожденных животных энтеробактериями и замедление процессов колонизации кишечной стенки нормальной микрофлорой: молочнокислыми бактериями, бифидобактериями, пропионовокислыми бактериями и энтерококками. Не случайно болезни молодняка, сопро-

вождающиеся диарейным синдромом, остаются наиболее сложной проблемой ветеринарной медицины.

Дисбактериоз кишечника замыкает патогенетический порочный круг, разорвать который необходимо как для успешной профилактики основного заболевания, так и для ликвидации его последствий.

Использование кормов, обогащенных биологически активными кормовыми добавками, натуральными продуктами с лекарственными свойствами, минеральными соединениями и витаминами, позволяет предотвратить развитие многих патологий у животных.

С этих позиций пробиотики следует рассматривать как часть рационального потенциала животных, поддержания их здоровья и получения продукции высокого качества, безопасной как в бактериальном, так и химическом отношении.

В состав пробиотиков включают типичных представителей нормальной микрофлоры толстого отдела кишечника — молочнокислые бактерии, бифидобактерии, энтерококки, играющие роль в защите кишечной стенки от избыточной колонизации грамотрицательной микрофлоры.

Механизм действия пробиотиков, в отличие от антибиотиков, направлен не на уничтожение, а на конкурентное исключение условно патогенной микрофлоры из состава кишечного микробиотопа. В процессе жизнедеятельности бактерии-пробиоты вырабатывают комплекс биологически активных соединений, избирательно воздействующих на условно-патогенные микробы. Например, бактериоцины резко снижают способность грамотрицательных бактерий к делению и размножению, молочная кислота замедляет их рост, перекись водорода разрушает их клеточную стенку. Таким образом, по силе воздействия на негативную кишечную микрофлору пробиотики, препараты из живых бактерий, могут быть альтернативой антибиотикам.

Бактерии-пробиоты обеспечивают опережающее заселение кишечника новорожденных нормальной микрофлорой и создают биологический барьер, преграждающий доступ к ней условно патогенных бактерий.

Первые попытки использовать пробиотики были связаны с поиском путей профилактики сальмонеллеза и колибактериоза в промышленном птицеводстве без применения антибиотиков, хотя по существу доказательство регуляторного влияния молочнокислых бактерий на микрофлору кишечника установил еще И. И. Мечников (1903–1905).

Эта задача остается актуальной и в настоящее время, так как дефицит нормальной микрофлоры у животных первых дней жизни приводит к бурному размножению нежелательной кишечной микрофлоры, замедлению процессов формирования иммунокомпетентных органов, сопровождается повышенной восприимчивостью к бактериальным и вирусным инфекциям.

Пробиотики, в отличие от антибиотиков, не вызывают привыкания со стороны условно патогенных бактерий, продукты жизнедеятельности бактерий-пробиотиков не накапливаются в органах и тканях животных и не влияют на товарное качество продукции. Они безопасны для окружающей среды и обслуживающего персонала.

В связи с этим отечественные и зарубежные ученые считают необходимым внедрение пробиотиков в систему выращивания животных для профилактики неинфекционных желудочно-кишечных заболеваний молодняка, поддержания колонизационной резистентности кишечника, повышения физиологического статуса организма новорожденных животных, стимуляции роста и развития, получения качественной продукции, безопасной в ветеринарно-санитарном отношении.

Проведено изучение экологических характеристик изолятов лактобактерий и бифидобактерий, выделенных из кишечника здоровых и больных животных. Научно обоснованы критерии отбора штаммов для производства пробиотиков ветеринарного назначения.

Исследования показали, что антагонистические свойства лакто- и бифидобактерий коррелируют с их адгезивной активностью. Наибольшие шансы для колонизации кишечника и выживания в нем имеют штаммы лакто- и бифидобактерий с высокой антагонистической и адгезивной активностью.

В состав пробиотических лекарственных средств входят микроорганизмы, безопасные для здоровья человека и животных, обладающие широким спектром протективных свойств, в частности бифидобактерии видов *Bif. bifidum*, *Bif. longum*, *Bif. thermophilus*, *Bif. globosum*, *Bif. adolescentis*; молочнокислые бактерии *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*; стрептококки *Str. faecium*, *Str. lactis*; спорообразующие бактерии *Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Ruminococcus albus*, *Bac. panthothenticus*.

Бактерии-пробиоты широко применяются при изготовлении микробиологических заквасок, они усиливают молочнокислое брожение и подавляют бродильные и гнилостные процессы при консервировании кормов.

Пробиотики широко используются в ветеринарии для стимуляции роста и развития молодняка, профилактики желудочно-кишечных заболеваний, восстановления кишечного биоценоза при стрессах и антибиотикотерапии.

**Пробиотики на основе молочнокислых бактерий.** К молочнокислым бактериям, широко используемым для производства пробиотиков, относятся молочнокислые стрептококки и палочковидные лактобактерии.

В молочной промышленности для изготовления различных продуктов из молочнокислых стрептококков наиболее часто применяют мезофильные стрептококки *S. lactis* и *S. cremoris*, которые относятся к группе гомотренерментативных, разлагающих молочный сахар до молочной кислоты. В отдельных случаях они образуют небольшие количества летучих жирных кислот и ацетона; являются активными кислотообразователями, оптимальной температурой их роста является 30°C для *S. lactis* и 25°C для *S. cremoris*.

Мезофильные гетеротренерментативные стрептококки (*S. paracitrovorus*, *S. diacetilactis*, *S. acetoinicus*, *S. citrovorus*) при расщеплении лактозы образуют молочную кислоту, при расщеплении лимонной кислоты образуют диацетил. Оптимальной температурой их роста является 30°C, а для *S. citrovorus* и *S. paracitrovorus* — 21–25°C.

Кроме мезофильных, к молочнокислым стрептококкам относятся и термофильные. Представлены они одним видом — *S. thermophilus*. Оптимальной температурой их роста является 40–45°C. Колонии имеют темную зернистую структуру, в мазках клетки крупные, сплюснены и располагаются цепочками разной длины. Являются сильными кислотообразователями.

К палочковидным молочнокислым бактериям относится род *Lactobacterium*.

К подгруппе термофильных палочек относятся *L. bulgaricum* и *L. acidophilum*, применяемые для приготовления кисломолочных продуктов, а также *L. helveticum*, используемый в сыроделии. Все они являются факультативными анаэробами. Плохо растут на поверхности агаровых сред, лучше в глубине агара. На поверхности плотных сред колонии негомогенные, а в глубине имеют форму кусочков ваты, т. е. колонии R-формы. В мазках располагаются одиночными клетками или цепочками. Являются энергичными кислотообразователями (до 300°C по Тернеру), молоко сбраживают за 3–5 ч. Оптимальной температурой роста является 40°C (для *L. acidophilum* — 37°C).

К подгруппе стрептобактерий относятся *L. casei* и *L. plantarum*, которые принимают участие в созревании сыра. Они представляют собой палочки разной длины, располагающиеся одиночно, попарно или в виде коротких и длинных цепочек. На плотных средах образуют мелкие круглые колонии (S-формы), иногда с выростом. Оптимальная температура роста около 30°C. Являются слабыми кислотообразователями, не свертывают молоко. По своим свойствам близки к ароматообразующим стрептококкам.

В настоящее время у всех видов молочнокислых бактерий найдены бактериофаги. Они являются строго специфичными, и поэтому с помощью явления бактериофагии можно дифференцировать молочнокислые бактерии. Основополагающим является то, что бактериофаги нарушают молочнокислое брожение при производстве творога, простокваш и сыров с низкой температурой второго нагревания.

В России чистые культуры молочнокислых бактерий стали применять с 1890 г. Большой вклад в разработку способов приготовления чистых культур, сохранения их в сухом виде и использования в производстве кисломолочных продуктов внес С. А. Северин.

И. И. Мечников, занимаясь проблемой старения людей, считал, что молочная кислота и другие продукты обмена молочнокислых бактерий, содержащиеся в простоквашах, подавляют гнилостную микрофлору кишечника и предотвращают преждевременное старение организма.

Однако многочисленные опыты, проведенные позже И. И. Мечниковым, показали, что болгарская палочка, вводимая в организм с простоквашей, не обладает специфической способностью приживляться в кишечнике, как ацидофильная, и исчезает из него вскоре после того, как прекращается пребывание в нем простокваши.

По данным американских ученых (Н. Копелов, Ф. Бирмарк, Л. Кальп, Л. Ретжер, В. Альбус), эта способность в гораздо большей степени присуща ацидофильной палочке как естественному представителю молочнокислых бактерий в нормальном кишечном биоценозе. По природе *Lactobacterium acidophilum* идентична болгарской палочке, но она уже адаптирована к условиям жизни в кишечнике.

Наряду с молочной кислотой многие кисломолочные продукты содержат специфические антибиотические вещества, подавляющие вредную микрофлору кишечника, в том числе и возбудителя туберкулеза.

Кисломолочные продукты широко применяются как для лечебного питания, так и для лечения людей и животных при ряде заболеваний. Так, кумыс, ацидофильно-дрожжевое молоко применяются при лечении туберкулеза, а ацидофильное молоко, простокваша, ацидофильная паста — как лечебно-диетические продукты при колитах, дизентерии, диспепсии у людей. Эти же кисломолочные продукты могут быть использованы и для лечения животных, особенно молодняка, при различных желудочно-кишечных заболеваниях.

Кроме того, для лечения молодняка животных при кишечных расстройствах применяются чистые ацидофильно-бульонные культуры (АБК), биобактон, лактобактерин, ацидофилин и другие чистые культуры молочнокислых бактерий.

Особенно важным является применение молочнокислых бактерий на фоне интенсивного лечения людей и животных антибиотиками. Как известно, антибиотики в большинстве своем не имеют избирательного действия на микроорганизмы. Наряду с возбудителями болезней они вызывают гибель нормальной микрофлоры кишечника. В ряде случаев это приводит к дисбактериозам, а иногда и к заболеваниям типа кандидомикоза и др. Применение же молочнокислых бактерий дает возможность восстановить нормальную микрофлору кишечника.

В настоящее время установлено, что наряду с молочной кислотой молочнокислые бактерии способны продуцировать антибиотические вещества (бактериоцины), подавляющие рост гнилостных, патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Так, *S. lactis* образует антибиотик низин, *S. cremoris* — диплококцин, *L. plantarum* — лактолин, *L. acidophilum* продуцирует антибиотические вещества, подавляющие рост возбудителей дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллеза, колибактериоза.

**Технология приготовления биобактона.** Биобактон представляет собой лиофилизированную культуру ацидофильной палочки, обладающей высокими антибиотическими и кислотообразующими свойствами. Культивируют ацидофильную палочку в обезжиренном молоке при 37°C в течение 10–15 ч, что совпадает со стационарной фазой культивирования, в этот период они являются более активными и стойкими к лиофилизации. Бакмассу концентрируют на суперцентрифугах, работающих на 16 000 об/мин. Полученный концентрат ацидофильной палочки обычно содержит 250–300 млрд клеток в 1 г.

Биобактон выпускают в лиофильно высушенном виде во флаконах с этикеткой, герметично закрытых алюминевыми колпачками. Перед выпуском контролируют

ют на антагонистическую активность, концентрацию, влажность.

**Технология приготовления лактобактерина.** Лактобактерин — это пробиотик, выпускаемый биологической промышленностью, предназначен для животных, в его состав входят *L. plantarum*, *L. ermentii*.

**Технология приготовления бифидумбактерина.** Бифидумбактерин представляет собой лиофилизированную микробную массу живых бифидобактерий. Бифидумбактерин предназначен для лечения и профилактики желудочно-кишечных болезней человека и животных.

По внешнему виду препарат представляет собой пористую массу бежевого цвета. В состав препарата входят сахароза и желатин, которые являются компонентами стабилизирующей среды высушивания. Препарат выпускают в виде сухой биомассы, лиофилизированной в ампулах или флаконах.

Все работы, связанные с пересевом, разведением, определением физико-химических характеристик бифидумбактерина, требуют соблюдения стерильности. Технологический процесс производства бифидумбактерина включает следующие стадии: приготовление питательных сред, выращивание посевного материала, культивирование, сублимационное высушивание, приготовление лекарственных форм, контроль готового препарата.

Контроль готового препарата осуществляется по следующим показателям: физические свойства, внешний вид, отсутствие посторонней микрофлоры, количество живых бифидобактерий в одной дозе препарата, активность кислотообразования, остаточная влажность, рН, герметичность.

**Технология производства пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*.** Во всем мире продолжается работа по созданию новых пробиотиков. Важным арсеналом разработки и совершенствования биопрепаратов являются бактерии рода *Bacillus*. Свойства некоторых штаммов этой группы бактерий настолько разносторонни, что только за последние годы на их основе разработано более десятка эффективных препаратов.

Важнейшими свойствами некоторых штаммов бацилл являются: антагонистическая активность ко многим патогенным и условно патогенным микроорганизмам; высокая ферментативная активность, позволяющая существенно регулировать и стимулировать пищеварение; противоаллергенное и антитоксическое действия и ряд других. Именно такими свойствами обладает медицинский препарат Биоспорин.

*Биоспорин* применяется для коррекции нарушений микрофлоры кишечника человека, вызванной нерациональным применением антибиотиков, нарушением питания, перенесенными инфекционными заболеваниями, для профилактики и лечения острых кишечных инфекций. Однако установлено, что спектр показаний для применения пробиотиков в клинической практике может быть существенно расширен.

*Биод-5* — новый пробиотик ветеринарного назначения, разработанный сотрудниками кафедры биотехнологии МГАВМиБ им. Скрыбина, включает два штамма бацилл — *B. subtilis* ТПИ 13 и *B. licheniformis* ТПИ 11.

Препарат предназначен для лечения животных, больных острыми кишечными инфекциями, вызванных сальмонеллами, шигеллами, стафилококками и другими патогенными микроорганизмами, для восстановления нормальной микрофлоры кишечника.

Технология предусматривает отдельное культивирование *B. subtilis* и *B. licheniformis* и смешивание их после стадии концентрирования в соотношении 3:1.

Одним из перспективных направлений разработки новых биопрепаратов является создание пробиотиков на основе микроорганизмов с заданными свойствами, полученными методами геной инженерии. Первый такой пробиотик медицинского назначения Субалин наряду с высокой антибактериальной активностью в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов характеризуется антивирусными свойствами. Этот препарат разработан в Институте микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины совместно с НПО «Вектор» (Россия) и в настоящее время проходит с успехом клинические испытания.

Создание пробиотиков и их широкое применение являются сегодня стратегическим направлением в борьбе со многими инфекционными заболеваниями человека и животных.

#### **10.4.2. Технология производства ферментных препаратов и выращивание плесневых грибов для пищевой промышленности**

*Ферменты* с древних времен используются в производстве многих пищевых продуктов. В качестве источников ферментов могут быть использованы органы животных, высших растений и микроорганизмы. В промышленности все шире применяют ферментные препараты, получаемые из культур микроорганизмов. Плесневые грибы, как богатейший источник ферментов, витаминов, антибиотиков и органических кислот, приобрели за последние годы огромное значение. Преимущество микробных ферментных препаратов состоит в следующем.

1. Простота и дешевизна выращивания микробов по сравнению с выращиванием животных и растений.
2. Чрезвычайно широкий ассортимент ферментов, продуцируемых клеткой.
3. Высокая активность микробных ферментов.
4. Наличие у микробов таких ферментов, которые отсутствуют у животных и растений.
5. Возможность при изменении условий выращивания изменять их ферментативную активность.

В настоящее время ферменты микроорганизмов применяют в *спиртовой, пивоваренной, хлебопекарной, винодельческой, соковой, текстильной, кожевенной* и других отраслях промышленности.

В бродильном производстве используют амилолитические ферменты. Традиционным источником этих ферментов является солод. Однако солодоращение очень трудоемкий и экономически затратный способ получения этих ферментов. Ферментные препараты плесневых

грибов значительно превосходят ферменты солода. Использование ферментных препаратов позволяет заменить 50% солода несоложенным сырьем в пивоваренной промышленности, при этом значительно снижается себестоимость пива и производственные потери. Полученное пиво при этом имеет нормальные качества.

*Протеолитические ферменты* плесневых грибов являются важным компонентом так называемых стабилизирующих агентов, применяемых для осветления и созревания пива и для борьбы с помутнением при хранении. Обработка пива ферментным препаратом является простым и дешевым способом повышения стойкости пива.

Очищенные ферментные препараты имеют также большие перспективы для применения в качестве улучшителей качества пшеничного хлеба. Прибавление ферментных препаратов в количестве 0,001% к весу муки улучшает качество хлебобулочных изделий, повышает удельный вес, объем, эластичность мякиша, пористость, улучшается вкус и аромат.

Ферментная обработка мезги до отжима таких трудно отдающих сок плодов и ягод, как яблоки, сливы, клюква, смородина, дает увеличение выхода сока на 15–20% и положительно сказывается на качестве готовой продукции. Плодово-ягодные соки, полученные из перечисленного сырья, обычно медленно осветляются и при хранении образуют большие осадки. Основной причиной, обуславливающей плохую сокоотдачу и стойкую муть, является наличие коллоидного пектина. Пектиновые вещества играют роль стабилизаторов мути, повышают вязкость сока и отрицательно влияют на брожение и фильтрацию. Наилучшим способом удаления пектина (без влияния на цвет сока и аромат) является обработка сока пектинолитическим ферментом плесневых грибов.

В производстве *амилолитических, протеолитических и пектолитических ферментов* используются специально отобранные штаммы плесневых грибов, отличающихся высокой ферментативной активностью.

Для бродильных производств выращивают плесневые грибы *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori*.

Питательной средой для выращивания плесневого гриба *Aspergillus oryzae* являются пшеничные отруби — отходы мукомольно-крупяного производства; в них наиболее полно и в благоприятном соотношении содержатся необходимые для гриба питательные вещества — крахмал, аминокислоты, минеральные соли и т. д. Желательно, чтобы отруби были крупными, широколопастными, с содержанием крахмала при выращивании *Aspergillus oryzae* не менее 18–20%, *Aspergillus awamori* — не менее 14–16%. Мелкие, сильно истертые отруби не создают нужной крупнозернистой, рыхлой структуры питательной среды, что затрудняет ее аэрирование по всей толще и отрицательно влияет на развитие гриба.

Обычно отруби содержат большое количество микроорганизмов, для освобождения от которых их подвергают стерилизации текучим паром. Отруби загружают в стерилизатор и до обработки паром добавляют формалин и соляную кислоту. Добавка формалина способствует полной стерилизации. Соляная кислота подкисляет отруби до pH 4,8–4,9, что улучшает стерилизацию и в дальнейшем создает оптимальные условия для развития гриба. Кроме того, подкисление питательной среды подавляет нежелательную протеолитическую активность культуры гриба. В пивоваренном производстве протеолитические ферменты, вызывая слишком глубокий распад белка, снижают качество пива. В тех же случаях, когда культура гриба выращивается для других целей и в ней требуется большое содержание протеолитических ферментов, подкисление питательной среды производить не следует. После окончания стерилизации питательную среду охлаждают до 40°C подачей холодного стерильного воздуха. Для создания оптимальной влажности (57–59%) определенное количество кипяченой и охлажденной воды добавляется в отруби. Лучше аэрированная питательная среда получается при введении воды не в начале, а в конце стерилизации.

**Подготовка маточной культуры гриба *Aspergillus oryzae*.** Чистые культуры производственных штаммов *Aspergillus oryzae* должны находиться в микробиологической лаборатории, где их поддерживают в активном состоянии в течение всего периода хранения. Хранят культуры в пробирках на косом сусло-агаре в темном шкафу. Количество пробирок основного штамма должно быть не менее 8. Обычно раз в три месяца культура пересеивается на свежую питательную среду, регулярно контролируют морфологические, культуральные признаки, отсутствие загрязнения и ферментативную активность.

Для получения большой посевной массы, перед применением в технологическом процессе, чистую культуру размножают, для этого их вносят в посевные кюветы со специально подготовленными отрубями, разложенными равномерным слоем толщиной в 1 см.

Кюветы помещают в растительные камеры, где поддерживают оптимальные условия для роста гриба и *накопления им ферментов*: температура в начале процесса 32°C, в конце снижают до 27–28°C, относительная влажность воздуха 97–100%, длительность выращивания 24–26 ч. Гриб в процессе жизнедеятельности потребляет кислород, выделяет продукты жизнедеятельности и большое количество тепла. Поэтому воздух в растительных камерах должен регулярно обмениваться. Через 24–26 ч выращивания в кювете, мицелий гриба пронизывает массу отрубей, которые принимают форму и консистенцию плотного «пирога» и готовы к съему на сушку.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие периоды включает в себя инфекционный процесс?
2. На какие виды делят иммунитет?
3. Назовите основные классы иммуноглобулинов.
4. Что такое вакцины? Какие виды вакцин выделяют?
5. Расскажите о механизме действия пробиотиков.

## МИКРОФЛОРА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

**М**икрофлора пищевых продуктов является самым сложным объектом санитарной микробиологии. Это объясняется:

- разнообразием и обилием микрофлоры;
- использованием специфической микрофлоры при приготовлении многих пищевых продуктов;
- отсутствием полноценных методов индикации и выделения микроорганизмов.

Через пищевые продукты могут передаваться возбудители бактериальных инфекций: сальмонеллеза, эшерихиоза, ботулизма, холеры, туберкулеза, бруцеллеза, сибирской язвы, риккетсиоза; вирусных инфекций, таких как полиомиелит и ящур.

Санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов проводится:

1) для определения качества сырья, из которого готовят продукт, при плановом контроле качества продукта и соответствия его ГОСТ и другим нормативным документам;

2) в плановом порядке для контроля за соблюдением санитарно-гигиенического режима в процессе приготовления, хранения и реализации. По эпидемическим показаниям, в случае вспышки какой-либо инфекционной

болезни, для обнаружения и выделения патогенных и условно патогенных микроорганизмов и их токсинов;

3) по специальным показаниям, в случае сомнения и порчи сырья или готовой продукции.

Микроорганизмами, свидетельствующими о санитарном неблагополучии, являются: бактерии группы кишечной палочки (БГКП), энтерококки, палочки протей, клостридии. При микробиологическом исследовании пищевых продуктов и производственного оборудования проводятся количественные (количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов — МАФАНМ) и качественные исследования. Качественное исследование проводят с определением родовой или групповой принадлежности таких микроорганизмов, как БГКП, сальмонеллы, стафилококки, клостридии, плесневые грибы, дрожжи и др.

### **11.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МЕЗОФИЛЬНЫХ АЭРОБНЫХ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (МАФАНМ)**

Суть метода основана на количественном подсчете колоний микроорганизмов, вырастающих на плотной питательной среде при 30°C в течение 72 ч. При микробиологическом исследовании продукта следует выбирать такие разведения, при посеве которых на чашках Петри вырастет не менее 30 и не более 300 колоний. При посеве продуктов, не требующих разведений, учитывают все колонии, выросшие в чашках.

При бактериологическом посеве цельного продукта или каждого соответствующего разведения вносят по 1 мл одновременно в три чашки Петри и заливают в каждую чашку Петри по 15 мл расплавленного и охлажденного до 45–50°C МПА. Содержимое чашек быстро перемешивают путем вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала, что-

бы выросли изолированные колонии. После застывания агара чашки с посевами помещают в термостат дном вверх, инкубируют при 30°C в течение 72 ч. После инкубации в термостате проводится подсчет количества выросших колоний, вычисляется среднее арифметическое по трем чашкам и проводится оценка качества продукта.

В некоторых случаях, при определении общей микробной обсемененности мяса, как ориентировочный метод можно применить метод мазков-отпечатков, приготовленных из глубоких слоев исследуемого продукта, с последующим изучением под микроскопом.

Качественное исследование проводят для определения родовой или групповой принадлежности таких микроорганизмов, как БГКП, сальмонеллы, стафилококки, клостридии и др.

На многие пищевые продукты установлены нормативы минимальной массы, в которой не допускается наличие кишечной палочки. Индикация присутствия БГКП проводится бродильным методом, для посева используют то количество продукта (1 г и т. д.), в котором предусматривается отсутствие БГКП. Для определения бродильного титра молока, рыбы лучше делать посев на среду Кесслера, в состав которого входит лактоза, генцианвиолет, ингибирующий рост грамположительной микрофлоры, желчь, способствующая росту кишечной палочки, и поплавки для учета газообразования. Для исследования мяса и мясной продукции рекомендуется среда Хейфеца, в состав которой входят лактоза, розоловая кислота и метиловый голубой (стерильная среда красно-фиолетового цвета после посева изменяется до зелено-салатового). При наличии признаков роста на средах Кесслера или Хейфеца для окончательного заключения о наличии в продукте БГКП из подозрительных пробирок делают посев штрихом на агар Эндо. Дальнейшая идентификация колоний, выросших на агаре Эндо, ведется по обычной схеме.

## 11.2. ВОЗБУДИТЕЛИ ПИЩЕВЫХ ОТРАВЛЕНИЙ

В настоящее время в соответствии с классификацией, утвержденной Министерством здравоохранения, пищевые отравления бактериальной природы разделены на:

- пищевые токсикоинфекции;
- пищевые токсикозы;
- пищевые отравления смешанной этиологии;
- грибковой этиологии.

Размножение возбудителей пищевых отравлений возможно при нарушении санитарных правил и норм заготовки сырья, при их неправильной транспортировке, превышении сроков хранения и при приготовлении из такого сырья готовых изделий.

К **пищевым токсикоинфекциям** относятся острые кишечные заболевания, возникающие при употреблении в пищу продуктов, в которых произошло массивное размножение бактерий и накопление токсинов, выделяемых при гибели микробов. К возбудителям токсикоинфекций относятся: *E. faecalis*, *Proteus vulgaris* (*P. mirabilis*), *Vibrio parahaemolyticus*, *Bac. cereus*, *Cl. perfringens* (такие болезни, как эшерихиоз, сальмонеллез, дизентерия, иерсиниоз, тоже протекают по типу токсикоинфекции, но их изучают как возбудителей самостоятельных нозологических болезней).

### Энтерококки, или фекальный стрептококк

Энтерококки (*E. faecalis*) широко распространены в природе. В настоящее время энтерококки считаются **вторыми**, после БГКП, санитарно-показательными микроорганизмами (СПМ) при исследовании бассейнов, сточных вод, почвы. Во многих странах (Англии, Франции, США, странах бывшей Югославии) энтерококки признаны дополнительным показателем фекального загрязнения питьевой воды. Принадлежат к

стрептококкам группы D, обитающим в ротовой полости, кишечнике человека и животных. Они постоянно обнаруживаются в фекальных массах, хотя в количественном отношении их меньше ( $10^8$ – $10^9$  в 1 г), чем кишечных палочек. У здоровых людей доминирующим видом является *E. faecalis*, однако санитарно-показательными служат и остальные виды — *E. faecium* и *E. durans*. Энтерококки отличаются по ряду признаков от стрептококков других групп, в частности патогенных гемолитических групп А. Гемолизирующие стрептококки способны вызывать пищевые отравления и дисбактериозы кишечника.

**Морфология.** Слегка вытянутые кокки, размером 0,6–2,5 мкм, расположенные попарно и в виде цепочек, грамположительные, спор и капсул не образуют.

**Культивирование.** Хорошо растут на простых средах, температурный оптимум 37°C (в интервале 10–45°C), факультативные анаэробы, хемоорганотрофы (метаболизм ферментативный), пищевые потребности сложные. На МПА через сутки образуют мелкие, серовато-белые колонии, а МПБ становится мутным, на дне появляется плотный белый осадок.

**Биохимические свойства.** Расщепляют различные углеводы (чаще до кислоты) — лактозу, сахарозу, салицин, маннит, арабинозу, галактозу; проба на каталазу отрицательная, в редких случаях восстанавливают нитраты. Изменяют цвет лакмусового молока. МПЖ не разжижают.

Дифференцирующим признаком является способность развиваться на питательных средах, содержащих 6,5% NaCl, 40% желчи и метиленовую синь.

Для выделения фекального энтерококка из исследуемого материала, обильно загрязненного сопутствующей микрофлорой, применяют селективные среды: щелочно-полимиксиновые, желчно-полимиксиновые, агар с азидом натрия.

Дифференциацию энтерококков от стрептококков проводят по признакам, приведенным в таблице 2.

Таблица 2

## Дифференциация энтерококков от стрептококков

Признак	Энтерококк	Стрептококк
Температурный предел	10–45°C	25–37°C
pH 9,6	Рост	Нет роста
40% желчи	Рост	Нет роста
6,5% NaCl	Рост	Нет роста
Рост в молоке с 1% мет. сини	Рост	Нет роста
Терморезистентность при 60°C	Рост	Нет роста

**Вульгарный протей**

Первого представителя *P. mirabilis* выделил из гниющего мяса Хаузер (1885), предложивший название рода, обусловленное способностью его представителей менять внешние проявления роста на твердых средах (в честь сына Посейдона — водяного божества Протея, изменяющего свой облик в различных обстоятельствах).

Место обитания — в кишечнике многих видов животных, почве, сточных водах, в разлагающихся органических массах. Являются **третьей** по значимости группой санитарно-показательных микроорганизмов. Наибольшее санитарно-показательное значение имеют *P. vulgaris* и *P. mirabilis*. При этом наличие *P. vulgaris* обычно рассматривают как показатель загрязнения объекта органическими веществами, а обнаружение *P. mirabilis* — как показатель фекального загрязнения.

**Морфология.** Вульгарный протей имеет форму палочки, длиной 1–3 мкм. Палочки часто полиморфные, грамтрицательные, перитрихи, капсул не образуют.

**Культивирование.** Оптимальная температура 37°C (от 10 до 43°C), pH 7,2–7,4. Относятся к факультативным анаэробам, хемоорганотрофам, метаболизм дыхательный и ферментативный.

На МПА образуют два типа колоний: О-форма, неподвижные — образуют круглые, выпуклые, серо-белые колонии; Н-форма, подвижные — для них характерен феномен роения, на котором основан метод выделения

чистой культуры посевом в конденсационную воду скошенного агара по Щукевичу. Н-формы дают сплошной, ползучий рост с образованием концентрических колец роста по периферии, поэтому «понятие изолированной колонии» к ним не применимо. Уникальная способность к «феномену роения» используется как один из характерных признаков при определении вида. Наличие в питательной среде ингибиторов (солей желчных кислот, больших концентраций NaCl, мочевины, препаратов йода) обуславливает переход протей в неподвижную О-форму.

На МПБ наблюдается обильное помутнение, нежная пленка. Рост культуры сопровождается характерным гнилостным запахом.

По биохимическим свойствам очень активные: расщепляют углеводы до КГ (глюкозу, сахарозу, но не лактозу), восстанавливают нитраты, гидролизуют мочевины, вызывают быстрое разжижение МПЖ, образуют индол и  $H_2S$ , ферментируют каталазу, оксидаза-отрицательны. Обычно ацетилметилкарбинол не образует. Важнейшим признаком, отличающим протей от других энтеробактерий, является способность дезаминировать фенилаланин, при разложении, которого до фенилпировиноградной кислоты в присутствии  $FeCl_2$  происходит окрашивание питательной среды в зеленый цвет.

На среде Плоскирева формирует желтовато-розовые колонии, среда в зоне роста желтеет в результате подщелачивания. На висмут-сульфитном агаре через 48 ч образует серо-коричневые колонии. На агаре Эндо колонии бесцветны в связи с тем, что они не расщепляют лактозу.

Антигенная структура обусловлена наличием О-, Н- и К-антигенов, которые используются для серологической дифференциации при определении вида.

Основными источником загрязнения протеем внешней среды являются люди и животные. В 5–9% случаев протей обнаруживается в содержимом желудочно-кишечного тракта и в фекалиях здоровых животных и людей.

Проникновение протей в мясо и мясные продукты происходит эндогенным и экзогенным путем. Эндоген-

ное заражение отмечается при жизни животного, особенно при возникновении гастроэнтеритов и других болезней.

Но основным путем инфицирования продуктов питания является экзогенный. Кожный покров животных является одним из основных источников загрязнения мяса в процессе переработки скота. Применение дезинфицирующих растворов для обработки кожного покрова (0,5–2% -ными растворами хлорной извести) значительно уменьшает его микробное загрязнение, в том числе и протеом.

Из продуктов убоя здоровых животных чаще всего протей можно выделить из печени, реже — селезенки и соматических лимфоузлов.

Присутствие протей в воде, пищевых продуктах, смывах всегда свидетельствует о загрязнении объекта разлагающимися органическими субстратами и о крайне неблагоприятном санитарном состоянии. Пищевые продукты, загрязненные протеом, обычно выбраковывают. Воду, содержащую протей, нельзя пить. При исследовании качества пищевых продуктов индикация палочки протей предусмотрена ГОСТ.

### ***Bac. cereus***

Широко распространены в природе, в большинстве случаев являются сапрофитами.

**Морфология.** Подвижные, грамположительные палочки, длиной до 4 мкм, располагаются одиночно и цепочками, образуют эндоспоры.

**Культивирование.** Аэробы, мезофилы, оптимальная температура — 30°C. На МПА — колонии с зубчатыми краями. На МПБ — помутнение, нежная пленка, хлопьевидный осадок.

**Биохимические свойства.** На МПЖ — кратерообразное разжижение за 1–4 дня, обладают лецитовителазной активностью. Лакмусовое молоко не свертывают, индол не образуют. Глюкозу и сахарозу расщепляют до кислоты.

Бациллы образуют энтеротоксины только *in vivo*, во время прорастания спор. *Bac. cereus* вызывают два типа пищевых отравлений.

Первый тип — инкубационный период 4–5 ч, характеризуется изнурительной рвотой, диареей. Заболевание развивается при употреблении пищи, обсемененной большим количеством микроорганизмов. Часты случаи отравления в связи с употреблением жареного риса, содержащего проросшие споры *Bac. cereus*.

Второй тип — продолжительность инкубационного периода 17 ч, патогенез полностью опосредован действием энтеротоксина, вызывающего боли в животе, диарею.

Критерии санитарной оценки продуктов, загрязненных *Bac. cereus*, окончательно не разработаны. В 1 г сырья не должно содержаться более 100 микробных клеток *Bac. cereus*. В пастеризованных консервах наличие *Bac. cereus* не допускается.

Диагностическим признаком считается обнаружение *Bac. cereus* в подозрительных продуктах в количестве более  $10^5$  бактерий в 1 г/мл. Но даже накопление в продукте микроорганизмов в пределах  $10^6$ – $10^7$  и более не приводит к значительному изменению внешнего вида продукта и органолептических признаков.

### ***Cl. perfringens***

Широко распространен в природе, основной резервуар сохранения патогенных штаммов — желудочно-кишечный тракт здоровых животных, где он размножается и выделяется с фекалиями в почву. Таким образом, он входит в состав нормальной микрофлоры кишечника, количество клостридий в 1 г содержимого кишечника доходит до  $10^3$ – $10^6$  в 1 г. Микроб относится к санитарно-показательным микроорганизмам, хотя образование споры не позволяет этого делать, так как споры длительно сохраняются в объектах внешней среды.

На основании антигенного строения различают шесть сероваров, типы А и С вызывают пищевые токсикоинфек-

ции у людей. Термолабильный протеин, выделяемый при споруляции, вызывает рвоту, диарею и летальный исход.

**Морфология.** Толстые, неподвижные, грамположительные палочки, до 5–8 мкм длиной. Располагаются одиночно, изредка короткими цепочками. Образует споры клостридиального типа спороношения, очень устойчивые во внешней среде, выдерживающие кипячение до 2 ч, сама вегетативная клетка малоустойчива. В организме, когда входит в ассоциацию возбудителей, вызывающих газовую гангрену или злокачественный отек, образует капсулу.

**Культивирование.** Строгий анаэроб. Возможна быстрая индикация на среде Вильсон — Блера, за счет восстановления железа и появления черных колоний уже через 8–12 ч.

Вода, подаваемая на предприятия пищевой промышленности, должна проверяться на присутствие *Cl. perfringens*. Ее количество строго контролируется: в 100 мл воды не допускается наличие ни одной клостридии.

Определение присутствия клостридий перфрингенса как возбудителя пищевых отравлений проводят и в некоторых пищевых продуктах. Критический уровень *Cl. perfringens* в готовых блюдах равен 10 клеткам в 1 мл или 1 г продукта. Готовые консервы не должны содержать палочки и споры *Cl. perfringens*.

*Cl. perfringens* можно выявить в специях, мясном фарше. При нарушении условий хранения пищевых продуктов количество *Cl. perfringens* уже за 3 ч может увеличиться в 10 раз. Чаще всего причиной вспышек токсикоинфекций, вызванных *Cl. perfringens* типа А, являются мясные продукты, выработанные с нарушением установленных требований гигиены и санитарии или хранившиеся при температурах выше +5°C, а также изделий из мяса птицы, свежей и соленой рыбы, реже молока и молочных продуктов, салатов и др. Инкубационный период обычно равен 6–24, а иногда — 2–3 ч.

Обязательным условием возникновения токсикоинфекций является накопление в пищевом продукте боль-

шого количества (в 1 г  $10^6$ ) жизнеспособных бактерий. Энтеротоксин, образующийся в организме человека, увеличивает проницаемость кровеносных сосудов и вызывает усиление поступления жидкости в полость кишечника. Заболевания могут протекать в легкой и тяжелой формах. При первой форме изменения в желудочно-кишечном тракте небольшие, при второй — отмечаются резкие воспалительные и некротические процессы в кишечнике с явлениями острейшего гастроэнтерита.

В отдельных мясных продуктах (пастеризованные консервы) наличие *Cl. perfringens* не допускается — если хотя бы в одном из посевов обнаружены мезофильные клостридии *Cl. perfringens* и (или) *Cl. botulinum*, консервы оценивают как не отвечающие требованиям промышленной стерильности.

### 11.3. ВОЗБУДИТЕЛИ ПИЩЕВЫХ ТОКСИКОЗОВ

К пищевым токсикомам относятся бактериальные токсикозы: ботулизм, стафилококковая интоксикация и микотоксикозы.

#### Ботулизм

Ботулизм (от *лат. botulus* — колбаса) — тяжелый пищевой токсикоз, возникающий в результате употребления продуктов, зараженных палочкой ботулизма и их токсинами. Возбудитель — строгий анаэроб, размножается и выделяет экзотоксин в консервах, соленой рыбе, колбасе, ветчине, грибах домашнего консервирования.

При консервировании продуктов, загрязненных спорами ботулизма, и при нарушении технологических процессов стерилизации, при хранении консервов при температуре выше  $15-17^{\circ}\text{C}$  споры прорастают и вегетативные палочки ботулизма начинают продуцировать

экзотоксин. Изучено 7 сероваров экзотоксина — А, В, С, D, Е, F, G, — различающихся по антигенной структуре. В патологии человека имеют значение экзотоксины типа А, В, С, Е (А — самый сильный токсин). Экзотоксин всасывается в желудке и кишечнике, поражает черепно-мозговые нервы с явлениями атрофического паралича мышц лица и носоглотки: появляется двойное видение, нарушается акт глотания, исчезает голос (афония). Инкубационный период от нескольких часов до 10–12 сут.

**Морфология.** *Cl. botulinum* крупные — до 8 мкм, располагаются одиночно или короткими цепочками, подвижные, грамположительные палочки. Капсулу не образуют. Образуют споры через 48 ч, расположение споры субтерминальное.

**Культивирование.** Строгий анаэроб, оптимальная температура для типа А, В, С, D 34–36°C, для Е, F, G — 28–30°C, рН 7,2–7,4. На специальных плотных питательных средах в глубине образует колонии в виде «чечевицы» или комочков ваты. На МППБ — обильное помутнение, запах прогорклого масла и газ.

**Биохимические свойства.** Расщепляют до кислоты и газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, салицин, декстрозу и глицерин. МПЖ разжижается, кусочки печени расплавляются, мозговая среда чернеет. На кровяном агаре вызывает гемолиз эритроцитов, на поверхности кровяного агара образует колонии двух типов — S- и R-колонии.

Возбудитель ботулизма очень устойчив к неблагоприятным факторам. Споры хорошо переносят абсолютный холод, в почве сохраняются десятилетиями, выдерживают кипячение в течение 3–6 ч. Устойчивы к действию дезинфицирующих средств, например к 20%-ному формалину 24 ч, к этиловому спирту в течение 2 мес., к 5%-ной карболовой кислоте в течение 24 ч.

При кислой рН среды длительность обработки и температурного воздействия можно значительно уменьшить, даже, если в этих продуктах содержатся споры. Например, споры погибают при 100°C через несколько минут, если кислотность окружающей среды рН 3,5–4,5. Не удается культивирование культуры *Cl. botulinum*

в слабокислой среде — в пределах рН 4,5. Экзотоксин к высокой температуре не устойчив, он разрушается при кипячении через 15 мин, а при 80°C — 30 мин.

### **Стафилококковая интоксикация**

*Staphylococcus aureus* повсеместно распространен в природе, относится к нормальной микрофлоре кожи. Их можно обнаружить на слизистых оболочках дыхательных и пищеварительных путей. Относятся к условно патогенным микроорганизмам.

Стафилококки — относительно устойчивые микроорганизмы, они хорошо переносят высушивание. В жидкой среде при 70°C погибают через 1 ч, при 85°C — через 30 мин, при 100°C — за несколько секунд. Сухой жар убивает их за 2 ч.

В процессе культивирования стафилококки продуцируют экзотоксин. Энтеротоксины А, В, С, D, Е и F ответственны за развитие пищевых интоксикаций. Пищевые отравления клинически проявляются рвотой, болями и диареей уже через 2–6 ч после употребления в пищу инфицированных продуктов, обычно кондитерских изделий с кремом, консервов, мясных и овощных салатов.

Все типы токсинов не разрушаются под воздействием протеолитических ферментов (трипсин, хемотрипсин), однако при низких значениях рН пепсин инактивирует стафилококковый энтеротоксин. Устойчив к воздействию желудочного сока, хлора, формалина.

**Пищевые отравления смешанной этиологии** обусловлены совместным действием двух и более возбудителей, например *Bac. cereus* со *Staph. aureus* или *Bac. cereus* совместно с *E. coli*.

### **Пищевые отравления грибковой этиологии**

Это отравления, вызванные размножением токсигенных плесневых грибов, которые выделяют микотоксины в процессе жизнедеятельности, а также при разрушении

мицелия. Известны 200 видов грибов, способных при определенных условиях продуцировать микотоксины. Проблема микотоксикозов находится в центре внимания ВОЗ, институты питания разрабатывают предельно допустимые концентрации (ПДК). Например, наличие афлотоксина допускается до 5 мг/кг, а патулина — до 50 мг/кг.

**Отбор средней пробы.** В лабораторию посылают пробу массой 500 г. Диагностика микотоксикозов особенно трудна, так как возбудитель и токсин надо обнаружить и в исследуемых продуктах и организме больного.

**Органолептическая оценка** включает изучение внешнего вида, цвета, запаха — зерна, орехов, сырья, готовых продуктов питания и т. д.

**Микроскопическое исследование.** Видимые части мицелия, находящиеся на поверхности исследуемого продукта, вносят на предметное стекло в каплю, состоящую из равных объемов глицерина, спирта и воды, закрывают покровным стеклом, микрокартину изучают под увеличением в 400 раз. Обращают внимание на строение мицелия и органов спороношения, наличие перегородок. Особую трудность при идентификации составляет то, что микроскопические грибы часто имеют различную морфологию в естественном субстрате и искусственных питательных средах.

**Микологическое исследование** проводят **одновременно и параллельно** в двух направлениях.

*Посев на питательные среды для определения вида.* Для выращивания применяют специальные питательные среды: Сабуро, Чапека, сусло-агар, в состав которых вводят антибиотики, подавляющие развитие сопутствующей бактериальной микрофлоры. Культивирование посевов проводится при 27–28°C, через 3–10 дней по мере появления колоний приступают к определению рода и вида микроскопических грибов. При этом изучают культуральные и морфологические признаки выросших грибов.

*Токсикобиологическое исследование* проводят для определения наличия микотоксина в исследуемом продукте и токсичности гриба. Применяют следующие методы:

- скармливание лабораторным животным с последующим наблюдением;
- определение гемолитической активности микотоксина;
- проба на простейших;
- кожная проба на кроликах;
- химический метод — тонкослойная хроматография.

Для определения наличия микотоксина 6–7 животным скармливают исследуемый продукт в течение 8 дней подряд. Изучают появившиеся клинические признаки: рвота, диарея, взъерошенная шерсть. Животных усыпляют, исследуют внутренние органы, отмечают наличие кровоизлияний, жировое перерождение тканей печени, желудка.

Для определения гемолитической активности привлекают микотоксин по следующей методике: в колбу засыпают исследуемое зерно, заливают эфиром (хлороформом), сутки экстрагируют, затем фильтруют. Полученный прозрачный фильтрат выпаривают в вытяжном шкафу — на дне остается маслянистая масса, которую исследуют на токсичность.

Предложено много методов для определения токсичности исследуемого гриба. Самый доступный и легко выполнимый анализ проводят по следующей методике. На поверхности кровяного агара в чашке Петри раскладывают диски из фильтровальной бумаги, на которые наносят каплю изучаемого токсина, диффундирующего в толщу агара. Через некоторое время эритроциты лизируются и вокруг дисков появляются прозрачные зоны различного диаметра, в зависимости от силы токсина. На контрольные диски наносят растительное масло (вокруг них не должно быть никаких изменений).

Для проведения «пробы на простейших» исследуемый продукт заливают водой и сутки экстрагируют. Каплю экстракта наносят на предметное стекло и в эту каплю вносят взвесь простейших. Если продукт содержал токсичный гриб, движение простейших прекращается через 3–5 мин, а в дальнейшем происходит лизис и гибель клеток.

К более сложным методам относится **кожная проба на кроликах**. Суть этого метода сводится к тому, что полученный маслянистый токсин дважды через сутки втирают в подготовленный участок кожи кролика (5×5 см) и наблюдают за появляющимися изменениями. В зависимости от токсичности микроскопических грибов на коже по нарастающей появляются покраснение, утолщение кожной складки или выпотевание экссудата, трещины и некроз кожи.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В каких случаях проводятся санитарно-микробиологические исследования пищевых продуктов?
2. В чем суть метода определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов?
3. Как разделены пищевые отравления бактериальной природы?
4. Какие методы применяют при токсикобиологическом исследовании?

# МИКРОБИОЛОГИЯ МЯСА, МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ И ЯИЦ. КОНТРОЛЬ ИХ ПРОИЗВОДСТВА

## 12.1. МИКРОБИОЛОГИЯ МЯСА И МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

**М**ышцы и внутренние органы живых здоровых животных и птиц не содержат микробов. Об этом свидетельствуют данные специально проведенных исследований тканей и органов здоровых животных, убитых и вскрытых с соблюдением стерильности.

Однако при убое животных в условиях мясокомбината получают мясо и мясопродукты, содержащие различное количество сапрофитных микроорганизмов (кокковые, гнилостные палочки, бактерий группы кишечной палочки, дрожжи, споры плесневых грибов и актиномицетов), а иногда и патогенные бактерии.

Известны два пути обсеменения микроорганизмами органов и тканей животных: эндогенный и экзогенный.

*Прижизненное эндогенное* микробное обсеменение органов и тканей происходит у животных, больных инфекционными, инвазионными и незаразными заболеваниями, органы и ткани которых содержат возбудителя болезни (сальмонеллеза, рожи свиней, лептоспироза, листериоза).

У здоровых животных *эндогенное прижизненное* микробное обсеменение органов и тканей происходит при ослаблении естественной резистентности организма под влиянием различных неблагоприятных факторов: стрессы, утомление при транспортировке, голодание, переохлаждение, травмы. В результате ослабления сопротивляемости создаются благоприятные условия для проникновения микроорганизмов из кишечника через лимфатические и кровеносные сосуды в органы и ткани.

*Посмертное эндогенное* обсеменение органов и тканей начинается в момент убоя. Кровь, вытекшая из артерий, частично обратно засасывается через вены, при этом в кровяное русло с поверхности кожи, шерсти попадают бактерии, которые разносятся по органам и мышцам животного. Обсеменение поверхности мяса происходит при снятии шкуры и разделке туши. После смерти животного стенки кишечника становятся легко проницаемы для микробов, содержащихся в кишечнике, и они проникают в окружающие ткани. При повреждении кишечника происходит чрезвычайно сильное загрязнение мяса, подвижные микробы могут проникать в глубокие слои мяса при последующей транспортировке и хранении.

*Экзогенное загрязнение* мяса происходит при выполнении технологических операций разделки мясных туш. Источниками микробного обсеменения могут служить кожный покров животных, воздух, оборудование, руки и инструменты рабочих, а также вода, используемая для зачистки туш.

На поверхности мясных туш в основном встречаются бактерии группы кишечной палочки, стафилококки и стрептококки, различные виды гнилостных аэробных бацилл, анаэробные клостридий, молочнокислые бактерии, дрожжи и плесневые грибы.

### 12.1.1. Изменение микрофлоры мяса при холодильном хранении

В процессе холодильного хранения в зависимости от температурных режимов хранения охлажденного и мороженого мяса происходят изменения количественного и группового состава микрофлоры, размножение которой может вызвать порчу продукта.

Низкие температуры широко применяются для сохранения многих скоропортящихся продуктов. Различают две формы холодильного хранения продуктов: в охлажденном состоянии при температуре не выше 10°C и в замороженном виде при температуре от -15 до -25°C.

При хранении продуктов в охлажденном состоянии большое значение имеет относительная влажность воздуха в камерах холодильника, поскольку при высокой относительной влажности воздуха при температуре выше 0°C, многие плесневые грибы и некоторые психрофильные бактерии развиваются сравнительно интенсивно.

При хранении замороженных продуктов на микроорганизмы неблагоприятно действуют как сама низкая температура, так и обезвоживание продукта. Поскольку при замораживании продуктов большинство микробов не погибают, то после оттаивания продуктов микроорганизмы могут интенсивно размножиться и вызывать их порчу.

Плесневые грибы, гнилостные бактерии и дрожжи медленно развиваются в холодильниках, хотя оптимальная температура развития этих микробов 25–30°C. Такие микроорганизмы следует называть условно психрофильными, или психротрофными.

Холодоустойчивость различных микроорганизмов колеблется в широких пределах. Существуют микроорганизмы, размножающиеся и при температурах ниже 0°C. Если в продукте сохраняется вода, некоторые дрожжи и бактерии могут расти и при -5°C, а отдельные виды *Cladosporium herbarum* и *Penicillium glaucum* — даже при -8°C.

Подавляющее же большинство микроорганизмов не способно размножаться ниже  $0^{\circ}\text{C}$ . Многие гнилостные бактерии, энтеробактерии прекращают свое развитие при  $2\text{--}5^{\circ}\text{C}$ . Молочнокислые и патогенные бактерии не размножаются уже при температуре ниже  $10^{\circ}\text{C}$ .

Микроорганизмы, обладающие способностью расти при низких температурах, развиваются крайне медленно. Но многие из них длительное время остаются жизнеспособными и легко переносят даже суровые зимние условия.

Однако при длительном воздействии температуры ниже  $0^{\circ}\text{C}$  многие микроорганизмы постепенно вымирают, что можно объяснить неблагоприятным действием на них повышенного осмотического давления среды в результате испарения воды.

На поверхности туши находятся различные виды бактерий, которые могут быть представлены мезофилами, термофилами и психрофилами, т. е. микроорганизмами, имеющими неодинаковые температурные пределы роста.

В глубине охлажденного мяса температура должна достигать  $0\text{--}4^{\circ}\text{C}$ . В таком мясе в процессе длительного хранения могут развиваться только психрофилы.

Термофилы и большинство мезофильных бактерий, которые не развиваются при низких температурах, полностью приостанавливают свою жизнедеятельность, переходя в анабиоз. Но среди патогенных и токсигенных бактерий из группы мезофилов есть такие, которые длительное время сохраняют жизнеспособность при низких температурах (возбудители листериоза, ботулизма).

Размножение микроорганизмов в мясе при низких температурах проходит ряд фаз (лаг-фазу или фазу задержки роста, логарифмическую фазу, максимальную стационарную и фазу отмирания). В начальный период хранения охлажденного мяса психрофильные бактерии, находясь в лаг-фазе, некоторое время не размножаются. В этот период количественный и качественный состав микрофлоры мяса почти не изменяется. Продолжительность фазы задержки роста зависит от скорости охлаж-

дения, температуры и влажности воздуха при хранении мяса, а также от степени обсемененности микробами мясных туш, поступивших на хранение.

По истечении лаг-фазы психрофильные бактерии начинают усиленно размножаться и их количество возрастает. Психрофильные микроорганизмы, способные активно размножаться, со временем становятся преобладающими в составе продуктов, хранящихся в данных условиях.

На охлажденном мясе в аэробных условиях хранения размножаются неспоровые грамотрицательные бактерии, а также плесневые грибы и дрожжи. Активность развития той или иной группы зависит от температуры и влажности окружающей среды. Так, при неблагоприятных условиях для развития психрофильных аэробных бактерий (пониженная влажность и более низкая температура хранения) наблюдается активный рост плесневых грибов и аэробных дрожжей, которые имеют более низкие температурные пределы роста и менее требовательны к влажности.

При активном размножении микроорганизмов в результате их жизнедеятельности в конце стационарной фазы может наступить порча охлажденного мяса: ослизнение, гниение, кислотное брожение, пигментация, плесневение.

*Ослизнение* мяса является одним из наиболее часто встречающихся видов порчи охлажденного мяса при его хранении и транспортировке. Ослизнение появляется обычно в начальные периоды хранения, когда на поверхности мясных туш образуется сплошной слизистый налет, состоящий из различных бактерий, дрожжей и других микроорганизмов. Слизь становится заметной, когда количество бактерий на  $1 \text{ см}^2$  поверхности мяса увеличивается до  $10^7$ . При повышении температуры выше  $5^\circ\text{C}$  размножаются микрококки, стрептококки, актиномицеты, некоторые гнилостные и другие мезофильные микроорганизмы (*E. coli*, *Proteus*, *Streptococcus*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *Pseudomonas*).

*Гниение* происходит при хранении мяса с признаками ослизнения. Процесс гниения вызывают различные аэробные и факультативно-анаэробные, не образующие спор бактерии (вульгарный протей, флуоресцирующие бактерии), спорообразующие аэробные (сенная палочка, картофельная палочка) и анаэробные клостридии. Гниение мяса может происходить в аэробных и анаэробных условиях. В процессе гниения под влиянием протеолитических ферментов происходит постепенный распад белков мяса с образованием неорганических конечных продуктов — аммиака, сероводорода, индола, скатола, приводящих к накоплению токсических продуктов, плохим органолептическим показателям и непригодности продуктов для употребления. В зависимости от результатов ветеринарно-санитарной оценки и лабораторных исследований мясо направляют на утилизацию.

*Кислотное брожение* сопровождается появлением неприятного, кислого запаха, зеленовато-серой окраски на разрезе и размягчением мышечной ткани. Этому виду порчи чаще подвергается печень, характеризующаяся высоким содержанием гликогена. Этот порок происходит под влиянием психрофильных дрожжей и молочнокислых бактерий, в результате жизнедеятельности которых образуются кислоты. Образующиеся продукты брожения задерживают развитие гнилостных микробов, но создают благоприятные условия для плесневых грибов.

*Плесневение* происходит при низкой температуре хранения и в условиях пониженной влажности, так как плесневые грибы (*Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*) менее требовательны к влажности и имеют более низкие температурные пределы роста, чем аэробные бактерии. На поверхности мяса появляются колонии плесневых грибов, окрашенных в зеленый, белый и черные цвета. При невозможности полностью очистить мясо от налета плесени его направляют на утилизацию.

### 12.1.2. Консервирование мяса

Мясо — скоропортящийся продукт, чтобы его сохранить, применяют разные способы консервирования (физические и химические). К физическим способам относится консервирование мяса низкой или высокой температурой.

#### Мороженое мясо

При замораживании мяса происходит гибель значительного количества микроорганизмов. Количество погибших бактерий зависит от скорости и степени понижения температуры. Чем ниже температура ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), тем больше погибает микроорганизмов. При медленном неглубоком замораживании ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) микроорганизмов погибает меньше. Устойчивы к действию низких температур энтерококки и стафилококки, а наиболее устойчивыми оказались плесени и дрожжи. В процессе хранения мороженого мяса отмирание микроорганизмов, выживших при замораживании, замедляется. Скорость отмирания бактерий при хранении мороженого мяса находится в обратной зависимости от температуры: чем ниже температура, тем медленнее происходит отмирание. Но полного отмирания микроорганизмов в мороженом мясе не происходит, даже после длительного хранения замороженного мяса оно не становится стерильным и может содержать много живых сапрофитных микроорганизмов — возбудителей порчи, а иногда и патогенных бактерий.

Микроорганизмы, выжившие в процессе хранения мороженого мяса, при его оттаивании начинают размножаться в благоприятных условиях. Таким образом, низкая температура не стерилизует продукт, а лишь замедляет развитие в нем микробиологических процессов.

В процессе замораживания продукта часть микробов погибает, остальные переходят в анабиотическое состояние.

**Размораживание (дефростация) мяса.** Перед употреблением мясо размораживают при температуре от 1 до 8°C. Дефростированное мясо менее стойко, так как образовавшиеся при замораживании кристаллы льда разрывают мышечную ткань. Чтобы кристаллы меньше травмировали клетки ткани, мясо следует замораживать быстро при температуре -20°C. Количество микробов в дефростированном мясе быстро возрастает, поэтому такой продукт надо немедленно реализовать.

### **Консервирование мяса сушкой**

Сушка — один из самых старых способов сохранения мяса. В настоящее время применяют самый совершенный метод — сублимацию (лиофильный метод), т. е. обезвоживание в вакууме, предварительно замороженных продуктов, путем возгонки льда в парообразное состояние, минуя жидкую фазу. Температура сушки должна быть ниже температуры денатурации белков и на выходе из сушилки составлять 55–70°C. Продукты, высушенные таким способом, очень быстро (за 20 мин) восстанавливают свои первоначальные свойства и почти полностью сохраняют биологическую ценность. Содержание в мясе до 10% влаги препятствует размножению бактерий, а до 7% — создает неблагоприятные условия для развития даже плесневых грибов. Высушенное мясо следует предохранять от попадания микробов, так как с повышением влажности они быстро начинают размножаться и приводят продукт к порче.

### **Консервирование мяса высокой температурой (баночные консервы)**

Для консервирования применяют бактериально чистое мясо. Время и температура стерилизации зависят от количества микробов (особенно спорообразующих) в продукте. Наиболее устойчивы к высокой температу-

ре споры *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Cl. botulinum*. С увеличением числа спор в одном и том же объеме среды время стерилизации увеличивается.

Споры *Cl. botulinum* — самые опасные, так как выдерживают 3–6-часовое кипячение, а после превращения в вегетативные клетки продуцируют сильнейший токсин. На образование токсина влияют рН среды, количество жира и поваренной соли в среде.

Эффективность стерилизации при установленных режимах нагревания в основном зависит от количества микроорганизмов, находящихся в продукте. Кроме количественного и качественного состава микрофлоры продукта, на эффективность стерилизации оказывают влияние и другие факторы: химический состав продукта, его консистенция, рН. Причем разные факторы влияют неодинаково. Например, увеличение содержания жира в продукте уменьшает стерилизующий эффект, а увеличение концентрации соли и кислотности среды усиливает его.

В стерилизованных консервах все-таки остается некоторое количество спор, поэтому необходимо обязательно проводить микробиологический контроль. С этой целью до 10% продукции помещают на 10 дней в термостатную камеру при 37°C. Если в консервах сохранились бациллы, то часть их прорастает и в результате их жизнедеятельности выделяется газ, вызывающий бомбаж (вздутие) банок.

### **Химические способы консервирования**

*Посо́л* — один из древнейших и широко распространенных способов сохранения мяса. Он основан на свойстве соли повышать осмотическое давление, создавать плазмолиз и тем самым ингибировать микробиологические процессы. В состав рассола, кроме соли, входят нитраты (селитра), сахар. Все эти вещества во время посола проникают в мышечную ткань и обуславливают сложный физико-химический процесс. Нитраты под

действием денитрифицирующих бактерий переходят в нитриты, которые придают обесцвеченному солью мясу нормальный красный цвет, не исчезающий при варке.

В процессе посола из мяса в рассол диффундируют белки, экстрактивные вещества, некоторые из водорастворимых витаминов. В такой среде начинают развиваться галофилы — микробы, выдерживающие высокие концентрации поваренной соли. Они часто являются причиной порчи продукта, в рассоле могут находиться до 40 видов различных микроорганизмов: *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*. Грамположительные бактерии представлены *Bacillus*, реже *Clostridium* и плесневыми грибами.

При концентрации поваренной соли 20–25% размножение микроорганизмов почти полностью прекращается. Особенно чувствительны к повышенной концентрации поваренной соли молочнокислые и гнилостные бактерии, развитие которых прекращается при концентрации соли около 10%.

Плесневые грибы более приспособлены к изменению концентрации растворенных веществ в среде. Так, плесени, которые могут существовать как при невысоком осмотическом давлении, так и в средах с относительно высоким осмотическим давлением (с повышенным содержанием соли или сахара), называются осмоотолерантными (толерантный — терпимый). Известны и такие микроорганизмы, которые развиваются только в субстратах с высоким осмотическим давлением, они называются осмофильными. Осмофильные микроорганизмы, развивающиеся при высоких концентрациях соли (обитатели морей, соленых озер), называются галофилами (солелюбивыми), среди которых встречаются бактерии, дрожжи, плесени.

Соль или сахар могут подавлять развитие микроорганизмов при разных концентрациях в зависимости от pH среды. Так, развитие дрожжей в соленых продуктах подавляется при концентрации соли 14% в кислой, а при 20% — в нейтральной среде.

Поваренную соль и сахар широко используют для консервирования различных пищевых продуктов: соление рыбы, мяса. Стойкость этих продуктов объясняется повышенным осмотическим давлением в них, которое обуславливает плазмолиз клеток микроорганизмов. В данных условиях большая часть микроорганизмов сохраняет свою жизнеспособность, но не развивается.

*Копчение мяса* проводят также с целью сохранения продукта. Кроме потери воды, мясо при копчении подвергается воздействию продуктов сухой перегонки дерева (фенол, крезол, скипидар, древесный спирт, формальдегид, смолы, низкомолекулярные кислоты — уксусная, муравьиная, пропионовая и др.), которые действуют бактерицидно.

В процессе копчения мясные продукты приобретают специфический вкус и аромат. Из всех видов самый эффективный холодный метод копчения при температуре 18–22°C (3–7 сут), консервирующие вещества при этом глубже проникают в мясо и тем самым повышают его стойкость при хранении. Копчению можно подвергать мясо только от здоровых животных, так как возбудители туберкулеза, рожи свиней под действием продуктов сухой перегонки дерева не погибают.

## **12.2. МИКРОБИОЛОГИЯ ЯИЦ И ЯИЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

Свежеснесенное яйцо от здоровой птицы, как правило, не содержит микроорганизмов. Стерильность яиц сохраняется продолжительное время при хранении, это объясняется наличием естественного иммунитета: скорлупа защищает от проникновения микробов, а содержащийся в яйце лизоцим обладает способностью растворять и убивать многие микроорганизмы, особенно грамположительные. При продолжительном хранении яйцо высыхает, лизоцим постепенно инактивируется.

Обсеменение яиц микробами возможно эндогенным и экзогенным путем.

*Эндогенное* обсеменение происходит при формировании яйца в яичнике и яйцеводе несушек, больных сальмонеллезом (пуллороз), птичьим туберкулезом и другими инфекционными болезнями.

*Экзогенное* обсеменение яиц происходит при контакте с пометом птиц-бактерионосителей, при антисанитарных условиях получения и хранения яиц.

На скорость проникновения микробов через поры скорлупы в яйцо оказывает влияние окружающая среда: температура, влажность, степень свежести яиц и снижение активности лизоцима. При низкой температуре хранения скорость проникновения микроорганизмов замедляется, но психрофильные виды проходят через поры скорлупы и при нулевой температуре.

### **Гниение яиц**

Процесс расщепления сложных азотсодержащих органических соединений (преимущественно белков) ферментами микробов. Гниение яиц является одним из наиболее частых пороков бактериального разложения. В начальной стадии порчи микроорганизмы образуют на поверхности оболочек изолированные очаги в виде отдельных колоний. При размножении в яйце гнилостных микробов наступает его порча, внутри яйца накапливается значительное количество газов, иногда взрывающих скорлупу. В некоторых случаях содержимое яйца приобретает серо-зеленую окраску и издает сильный запах сероводорода, при бактериологическом исследовании выделяются *Pseudomonas*, *Serratia*, *E. coli*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* и *Proteus*, разжижающие содержимое яйца и окрашивающие его в темный цвет.

### Плесневение яиц

Поверхность скорлупы при хранении в антисанитарных условиях загрязняется различными бактериями, плесневыми грибами, актиномицетами и др. При хранении яиц в условиях повышенной влажности гифы микроскопических грибов проникают внутрь и образуют разветвленный мицелий, заполняющий всю белочную полость, который при овоскопии обнаруживается в виде темного пятна.

Из плесневых грибов чаще выделяются грибы рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* и *Mucor*.

Яйца с пороками бактериального и плесневого происхождения подлежат утилизации или уничтожению.

#### 12.2.1. Инфекции, передаваемые через яйцо

Они нередко являются общими для человека и птицы. Наибольшую опасность для человека представляют бактерии из рода *Salmonella*. Заражение яиц этими бактериями большей частью связано с сальмонеллезом птиц, которые наиболее часто распространены среди водоплавающих птиц и вызываются преимущественно *S. typhimurium*, а у кур — *S. gallinarum*, *S. pullorum* и др.

Заражение птиц сальмонеллами происходит через корм, воду и объекты внешней среды. Болезнь поражает главным образом молодняк, у которых сальмонеллез протекает остро и характеризуется высоким процентом гибели. У взрослых птиц чаще встречается латентная форма, что является особенно опасным, так как инфицированные птицы становятся бактерионосителями, от которых и происходит эндогенное заражение яиц и животноводческих помещений. Однако внедрение бактерий в яйцо, снесенное здоровыми животными, может произойти и после кладки, при загрязнении яйца пометом бактерионосителей, т. е. заражение яиц сальмонеллами может произойти как эндогенным, так и экзогенным путем.

В целях предупреждения пищевых токсикоинфекций утиные и гусиные яйца, а также яйца кур из неблагополучных по туберкулезу хозяйств разрешается использовать только в хорошо пропекаемых изделиях из теста или сваренными вкрутую (кипятить не менее 13–14 мин). Для профилактики загрязнения пищевых предприятий яйца водоплавающих птиц следует обрабатывать в отдельном помещении с последующей его дезинфекцией.

### 12.2.2. Хранение яиц

Стерильность яиц сохраняется длительное время, но при продолжительном хранении его рН повышается, лизоцим постепенно инактивируется, яйцо высыхает, изменяется консистенция белка, желток становится подвижным, создаются условия для проникновения и размножения в яйце микроорганизмов. Чтобы замедлить процессы старения, яйца надо хранить в прохладных сухих помещениях.

Наряду с физическими происходят и химические качественные изменения. Замедлить порчу до 6 мес., можно при хранении яиц при 2°С и влажности 85%. Для установления свежести яиц применяют овоскопирование: свежие яйца хорошо пропускают свет, у старых яиц воздушная камера (пуга) увеличена, а содержимое становится более темным.

**Консервирование яиц** представляет собой создание неблагоприятных условий для размножения микроорганизмов. Для консервирования яиц, предназначенных для длительного хранения, применяют высушивание меланжа для получения яичного порошка или замораживание.

Высушивание яичной массы для получения яичного порошка проводят по следующей методике. Отобранные после овоскопирования яйца моют, дезинфицируют, а затем разбивают и освобождают от скорлупы. Далее для получения меланжа желток и белок дробят, смешивают

и фильтруют для отделения частиц скорлупы, волокон и пленок. Полученный меланж поступает на быстро вращающийся диск в сушильную камеру, температура воздуха в зоне распыления яичной массы составляет около 50°C. Микробиологическое исследование яичного порошка показало, что термический режим сушки не обеспечивает нужного бактерицидного действия, в частности в отношении кишечной палочки и протей, которыми бывает загрязнен исходный материал. Поэтому количество влаги в полученной массе должно быть снижено до 5–9%, что задержит развитие оставшейся микрофлоры. Яичный порошок расфасовывают в жестяные банки с пергаментной прокладкой и хранят при температуре не выше 15°C.

Яичный порошок можно применять только после термической обработки, обеспечивающей достаточную стерилизацию.

Для перевозки и длительного хранения яиц их превращают в меланж (смесь), представляющий собой смесь замороженных белков и желтков, для замораживания используют только доброкачественные куриные яйца.

Для уменьшения бактериального обсеменения меланжа отобранные после овоскопии яйца моют, дезинфицируют, а затем разбивают и освобождают от скорлупы, белок и желток смешивают, фильтруют, разливают в жестяные банки, запаивают и замораживают. Полученную замороженную смесь хранят при температуре –5... –10°C. Хотя содержимое яиц было стерильно, готовый меланж содержит значительное количество микроорганизмов (сотни и даже миллионы в 1 г). В меланже могут содержаться *E. coli*, *Staphylococcus*, *Proteus* и аэробные бациллы, которые после размораживания быстро размножаются, поэтому меланж надо размораживать только перед использованием, чтобы оставшаяся микрофлора не успела активизироваться.

Меланж, имеющий хорошие органолептические показатели с коли-титром не ниже 0,1 мл, при отсутствии в нем патогенных микробов допускается для изготовления всех продуктов, которые по технологическим условиям произ-

водства обязательно подвергаются термической обработке в условиях, обеспечивающих пастеризацию.

Учитывая особую опасность развития патогенных бактерий и возникновения пищевых отравлений, для приготовления кремов разрешается использовать только чистые целые яйца. Для этого до разрушения скорлупы яйца рекомендуется погружать в раствор аммиачного серебра 1:20 000 на 15 мин или 2% -ный раствор хлорной извести на 5 мин с последующим погружением в 2% -ный раствор двууглекислой соды ( $\text{NaHCO}_3$ ) и последующим промыванием водой.

Меланж готовят только из куриных яиц и используют только на предприятиях пищевой промышленности, в свободную продажу населению меланж не поступает.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите химические способы консервирования мяса.
2. Назовите пути обсеменения микроорганизмами органов и тканей животных.
3. Назовите варианты порчи охлажденного мяса.
4. Назовите инфекции, передаваемые через яйцо.
5. По какой методике проводят высушивание яичной массы для получения яичного порошка?

## **МИКРОБИОЛОГИЯ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ. КОНТРОЛЬ ИХ ПРОИЗВОДСТВА**

**М**олоко — секрет молочной железы млекопитающих. Состав коровьего молока (в %): вода — 87; молочный сахар — 4,7; молочный жир — 3,9; белки — 3,3; минеральные вещества — 0,7; витамины и ферменты.

Академик И. П. Павлов писал: «Молоко — это изумительная пища, приготовленная самой природой». Установлено, что этот продукт содержит более ста ценнейших компонентов. В него входят все необходимые для жизнедеятельности организма вещества — белки, жиры, углеводы, минеральные соли, витамины. Таким образом, в молоке природа «подобрала» все компоненты в очень удачных пропорциях.

Молоко является хорошей средой для размножения и сохранения микроорганизмов. Получить стерильное молоко невозможно, так как в сосковом канале (сообщающимся с внешней средой) находятся представители нормальной микрофлоры вымени: маммококки, микрококки, молочнокислые стрептококки и палочки.

## **13.1. МИКРОФЛОРА МОЛОКА И ИСТОЧНИКИ ЕГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

### **13.1.1. Происхождение микрофлоры молока. Источники загрязнения**

Молоко по своему составу представляет благоприятную среду для развития и размножения различных микроорганизмов, поэтому в нем всегда можно встретить то или иное количество микробов.

Молоко на своем пути от вымени до потребителя проходит в тесное соприкосновение с целым рядом источников загрязнения. Эти источники далеко не равноценны, как по обилию, так и по видовому составу вносимых бактерий.

### **13.1.2. Микрофлора, получаемая молоком из вымени**

Этот источник поставлен на первое место в силу его чрезвычайного постоянства и абсолютной неизбежности. В сосковом канале всегда содержатся бактерии: облигатные — микрококки, маммококки (кокки вымени безвредны) и факультативные — молочнокислые стрептококки, могут быть и патогенные стафилококки. Они образуют бактериальную пробку соскового канала, если ее не сдаивать отдельно, то это приведет к увеличению количества бактерий в общем удое в три раза.

Большое влияние на бактериальное загрязнение молока при доении оказывает и санитарное состояние животных: кожа животного, руки доярки, пыль от подстилок, молочное оборудование и посуда.

Кожа животного, как источник загрязнения, характеризуется обилием и трудной устранимостью, ввиду загрязнения кожи частицами навоза. Во время дойки на поверхность молока, должно быть, падает настоящий

дождь из кишечных палочек, энтерококков, аэробов и анаэробов, дрожжей и плесневых грибов и др. (перечень этих микроорганизмов очень важен, так как именно они будут составлять нормальную микрофлору молока). Следовательно, степень бактериального загрязнения молока зависит от способа обработки кожи и вымени перед доением. На практике часто для обмывания вымени используют одно ведро, одно полотенце для всей группы, на 1 см<sup>2</sup> такого полотенца может быть обнаружено до 214 млн бактерий.

При машинном доении коров исключаются многие источники загрязнения, однако, при содержании доильных аппаратов в антисанитарном состоянии они становятся значительным источником микробного загрязнения (в основном психрофильных бактерий). Например, если после дезинфекции 0,2% -ным раствором хлораминна новые молочные шланги становятся почти стерильными, то на старых шлангах, имеющих на внутренней поверхности трещины, после такой же обработки обнаруживалось на 1 см<sup>2</sup> до 940 тыс. бактерий. Таким образом, роль молочной аппаратуры двойственна: с одной стороны, молочная аппаратура является наиболее совершенной защитой от загрязнения, а с другой — она может отдать молоку свою собственную микрофлору.

Источником загрязнения молока может быть пыль, попадающая при раздаче кормов и сухой уборке. Применение в качестве подстилки прелой соломы увеличивает число микроорганизмов, особенно спорообразующих и плесневых грибов в воздухе, вместе с пылью в молоко попадают и микробы.

Рекомендуется в качестве подстилки использовать свежую солому, опилки или торф, которые хорошо поглощают влагу, газы и в некоторой степени препятствуют развитию гнилостных и патогенных микроорганизмов.

Можно сделать вывод, что источники загрязнения могут быть устранены при соблюдении зоогигиенических правил содержания коров и санитарно-гигиенических условий в процессе получения молока. Познакомившись

с источниками загрязнения молока, мы получили представление о составе микрофлоры свежего молока.

### 13.1.3. Изменение микрофлоры молока при хранении и транспортировке

Количественные и качественные изменения микрофлоры молока зависят от температуры, продолжительности хранения и состава ее при получении. Так, при хранении молока при 10°C происходит последовательная смена фаз.

*Бактерицидная фаза.* Сущность этой фазы в том, что количество микроорганизмов в свежевыдоенном молоке в процессе хранения уменьшается. Эти свойства молока объясняются наличием в молоке различных противомикробных веществ: лактенинов, бактериолизинов, лизоцима и др. Продолжительность бактерицидной фазы изменяется в широких пределах и зависит от следующих факторов:

1) количество бактерий, попавших в молоко во время дойки;

2) температура хранения (бактерицидные свойства молока сохраняются в течение суток, если температура ниже 10°C, и только 6 ч — при температуре 25°C);

3) индивидуальных свойств организма животного и периода лактации.

*Фаза смешанной микрофлоры.* После окончания бактерицидной фазы, когда в молоке уже нет веществ, задерживающих развитие микробов, а температура хранения выше 10°C, в молоке начинают размножаться все оставшиеся к этому моменту микроорганизмы. Эта фаза является периодом наиболее быстрого возрастания числа микроорганизмов. В течение этого периода, который продолжается 12–18 ч, микрофлора возрастает в сотни тысяч раз. Рассматриваемая фаза смешанной микрофлоры с практической точки зрения особенно важна, так как именно в этой фазе молоко попадает к потребителю.

*Молочнокислая фаза.* За начало этой фазы принимается момент, когда в молоке обнаруживается заметное нарастание кислотности. С определенного момента перевес над всеми имеет *Str. lactis*, по мере их размножения кислотность молока снижается до рН 4. Такая кислотность неблагоприятна для стрептококков, на смену им начинают развиваться кислотоустойчивые (рН до 3,6) молочнокислые палочки. Таким образом, здесь можно говорить о двух ясно различимых фазах, сменяющих одна другую в определенной последовательности. Повышение кислотности оказывается губительным для гнилостной микрофлоры, а также для бактерий группы кишечной палочки.

Продолжительность молочнокислой фазы больше, чем какой-либо другой фазы, может тянуться месяцами без заметного изменения в микрофлоре при соответствующей температуре. Но надо учитывать, что молочнокислая фаза в целом охватывает собой то состояние молока, в котором оно квалифицируется как кисломолочный продукт.

*Фаза развития дрожжей и плесеней.* Эта фаза не представляет практического интереса и вряд ли придется наблюдать ее в практических условиях (мы даем ее для полноты картины). Обычно молоко не доживает до этой фазы, будучи потребленным в течение молочнокислой фазы. Внешняя картина развития этой фазы такова: еще во время молочнокислой фазы на поверхности сгустка образуются отдельные колонии *Oidium lactis*, постепенно смыкающиеся в сплошную белую пушистую пленку. В это же время можно наблюдать появление пленчатых дрожжей, позднее появляются пигментированные колонии плесневых грибов *Penicillium*, *Aspergillus*, вытесняющие *Oidium*. В молоке появляется прогоркание за счет разлагающегося жира, плесневый и дрожжевой привкусы. Затем под плесневой пленкой начинают появляться первые признаки разложения и пептонизации белков в виде жидкости от светло-желтого до темно-бурого цвета. Слой жидкости увеличивается за счет сгустка, и в конце концов от сгустка не остается и следа: все превращается в бурую жидкость, закрытую сверху толстой пленкой плесени.

### 13.1.4. Нормальная микрофлора молока

Вся микрофлора молока делится на нормальную и аномальную. К нормальной микрофлоре относится такая, которая постоянно присутствует в молоке, это: молочнокислые бактерии, микрококки, сарцины, энтерококки, бактерии группы кишечных палочек, маслянокислые бактерии, гнилостные бактерии, плесневые грибы и дрожжи.

Из перечисленных видов особый интерес представляют молочнокислые бактерии. Как показывает их название, основным продуктом их жизнедеятельности является молочная кислота. Молочнокислые бактерии применяются при изготовлении кисломолочных продуктов, сыра и масла. Поэтому мы дадим подробную характеристику молочнокислым бактериям. Все молочнокислые бактерии объединены в семейство *Lactobacteriaceae*:

1) род *Streptococcus*:

- *Str. lactis*;
- *Str. cremoris*;
- *Str. thermophilus*;

2) род *Lactobacterium*:

- *L. acidophilum*;
- *L. bulgaricum*;
- *L. casei*.

## 13.2. ПОРОКИ МОЛОКА МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

При длительном хранении сырого и пастеризованного молока в нем начинают проявляться признаки порчи, вызванные размножением, вышеперечисленной микрофлоры. Характер порчи зависит от температуры хранения и вида преобладающих микроорганизмов.

*Аммонификаторы* (гнилостные микроорганизмы) могут размножаться при низкой температуре хранения молока,

так как относятся к психрофильным бактериям. В процессе разложения белков изменяется консистенция молока, появляется горечь.

*Маслянокислые* бактерии широко распространены в природе. Они обнаруживаются в большом количестве на предметах ухода, в кормах и при несоблюдении санитарных условий попадают в молоко. При пастеризации споры маслянокислых бактерий не погибают, при длительном хранении молока они расщепляют лактозу до масляной кислоты и газа, придающих молоку прогорклый вкус и запах.

*Плесневые грибы* образуют островки колоний на поверхности свернувшегося молока, придают ему горький вкус и плесневый запах. Наличие плесени свидетельствует о длительном хранении молочного продукта при низкой температуре.

*Кишечная палочка*, находящаяся в молоке в больших количествах, придает ему стойловый запах, а при благоприятной температуре сбраживает лактозу с образованием кислоты и газа. Молоко, содержащее кишечную палочку, нельзя использовать для приготовления кисломолочных продуктов, сыров, так как *E. coli* вызывает в них пороки.

### 13.3. ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ЧЕРЕЗ МОЛОКО

Возбудители инфекционных болезней попадают в молоко от больных животных, из окружающей среды во время транспортировки или переработки. Микробы, передаваемые через молоко, делятся на две группы. В первую входят *возбудители зооантропонозов*, которые передаются от одного вида животного к другому и от животного к человеку. К ним относятся: возбудители туберкулеза, бруцеллеза, сибирской язвы, ящура и др. Во вторую группу входят *возбудители антропонозов* —

болезней, которые передаются от человека к человеку (дизентерия, дифтерия, брюшной тиф, скарлатина).

При попадании патогенных возбудителей от больных людей и животных в молоко происходит их размножение и накопление токсинов в молоке, что приводит к возникновению пищевых токсикоинфекций при употреблении такого молока.

Дезинфекцию на молочных фермах следует рассматривать как важную меру, дополняющую пастеризацию молока и направленную на предупреждение зоонозов и зооантропонозов, которые передаются человеку через молоко, включая сальмонеллез. Доильные аппараты, ведра, бидоны и другие емкости следует дезинфицировать; для этого применяют различные химические средства, например кальцинированную соду и гидроксид калия.

## 13.4. СОХРАНЕНИЕ МОЛОКА ФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Молоко, поступающее на молочные заводы, характеризуется значительным бактериальным загрязнением (от сотен тысяч до миллионов в 1 мл), особенно в жаркое время года. Бактериальное загрязнение молока может быть снижено, если на всем пути от коровы до потребителя будет соблюдаться санитарно-гигиенический режим и молоко будет своевременно охлаждаться. Особенно эффективно действует глубокое охлаждение непосредственно после удоя, так как этим удлиняется и используется бактерицидная фаза. Хранить молоко следует при температуре не выше 6–8°C, а лучше при 2–4°C.

**Замораживание молока** позволяет приостановить в нем бактериальные процессы на длительный срок. При этом для предотвращения выпадения казеина в осадок следует применить быстрое замораживание при –25°C. Холод не вызывает гибель микроорганизмов, а переводит их в анабиотическое состояние и при оттаивании молока их жизнедеятельность возобновляется. Следова-

тельно, с помощью холода можно сохранить только бактериально чистое молоко, в котором мало бактерий.

Высокая температура, в отличие от холода, вызывает гибель микробов, что повышает стойкость продукта, поэтому обработка молока таким методом получила широкое распространение.

**Кипячение молока**, хотя и обеспечивает высокий стерилизующий эффект, не может быть рекомендовано для молочной промышленности. При кипячении в значительной степени разрушаются витамины, денатурируются белки, ценный кальций оседает на стенки посуды, нарушается гомогенность жировой эмульсии, поэтому вместо кипячения применяют пастеризацию молока, после которой сохраняется биологическая ценность продукта.

Существует несколько режимов *пастеризации молока* от здоровых животных:

- а) длительная — 65°C в течение 30 мин;
- б) кратковременная — 74–78°C в течение 20 с;
- в) моментальная — 85–90°C без выдержки.

При правильно проведенной пастеризации погибает около 99% содержащихся в молоке бактерий, в том числе беспоровые патогенные виды (возбудители туберкулеза, бруцеллеза, сальмонеллеза, гноеродные кокки), кишечная палочка и молочнокислые бактерии.

После пастеризации молоко и сливки необходимо охладить до +4°C, чтобы предотвратить прорастание спор и размножение сохранившейся термофильной микрофлоры.

Хранение пастеризованного молока при комнатной температуре дает возможность беспрепятственно размножаться гнилостным и патогенным бактериям, если они там остались, так как бактерицидные свойства в пастеризованном молоке инактивированы. Пастеризованное молоко не скисает, но может подвергнуться гнилостному разложению (пептонизации) и приобрести ядовитые свойства при длительном хранении в холодильнике. Таким образом, из пастеризованного молока нельзя делать запасы и хранить его длительное время.

**Стерилизация молока** предусматривает полное уничтожение вегетативных и споровых форм бактерий, что позволяет хранить такое молоко длительное время. Стерилизованное молоко готовят тремя способами:

а) молоко стерилизуют 4 с при температуре 140°C, а потом разливают в бумажные пакеты с полиэтиленовым покрытием в асептических условиях, такое молоко может храниться 10 дней при температуре не выше 20°C;

б) молоко разливают в бутылки, укупоривают, а затем стерилизуют 15 мин при температуре 120°C;

в) молоко стерилизуют 2 с при 140°C, разливают в бутылки, укупоривают и вновь стерилизуют 15 мин при температуре 116°C, такое молоко может храниться до 2 мес.

**Ультравысокотемпературная обработка (УВТ)** — нагревание молока до 140°C в течение одной секунды происходит в трубчатых аппаратах путем введения химически чистого пара непосредственно в молоко в условиях полностью закрытого автоматизированного процесса. Этим устраняются окислительные процессы, приводящие к разрушению витамина С, удаляются летучие вещества кормового и стойлового происхождения. Такое молоко может храниться длительное время. В результате такой обработки погибают и споры, а все полезные вещества и микроэлементы в молоке сохраняются. При изготовлении такого молока используется только высококачественное сырье, так как молоко 1-го и 2-го сорта (по ГОСТ) просто-напросто свернется. Специально для УВТ-молока была изобретена новая, асептическая разновидность картонной упаковки с полиэтиленовым покрытием, такое молоко можно хранить при комнатной температуре.

**Консервированием** осуществляется уничтожение микробов или создание неблагоприятных условий для активности микробов, вызывающих порчу продуктов. Для приготовления консервированного сгущенного молока в банках его стерилизуют при 115–118°C в течение 15 мин. При такой температуре погибают вегетативные микробы, но часть спорообразующих может остаться.

Сохранившиеся споры в благоприятных условиях могут прорасти, разлагать продукт с образованием газов, которые вызывают бомбаж консервных банок. Для проверки качества стерилизации банки выдерживают в течение 10 сут при 37°C. Отсутствие бомбажа, указывает на хорошую стерилизацию банок, что позволяет хранить их длительное время.

**Сгущенное молоко с сахаром.** Сырое молоко сначала подвергают очистке и доводят содержание жира и сухих веществ до уровня, соответствующего требованиям ГОСТ. Затем молоко нагревают до кипения и выдерживают около 20 мин, при этом погибают все микроорганизмы, за исключением устойчивых к высокой температуре. Пастеризованное молоко сгущают до 1/3 первоначального объема, чтобы в нем содержалось не более 26,5% влаги, и к нему добавляют 43,5% сахара. При таком соотношении воды и сахара создается высокое осмотическое давление — условия, неблагоприятные для развития эшерихий, молочнокислых бактерий, дрожжей и многих плесневых грибов. Но при наличии шоколадно-коричневой плесени и цветных микрококков, обладающих протеолитическими свойствами, происходит порча продукта. Его сохранность в таком случае не превышает 6–12 мес. Соблюдение технологии и санитарных условий в процессе производства позволяет сохранить сгущенное молоко с сахаром в течение двух лет.

### **13.5. САНИТАРНО- МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОКА**

Для того чтобы не допустить распространения инфекционных болезней через молоко, проводится строгий ветеринарный и санитарный надзор за животными и предприятиями молочной промышленности (контроль сырья и процессов производства). Молоко, поступающее на молочный завод от производителя, в зависимости от

санитарно-микробиологических и физико-химических показателей делят на два сорта. Молоко 1-го сорта должно иметь кислотность 16–18°Т (по Тернеру), микробную обсемененность по редуктазной пробе не ниже 1 класса и степень чистоты I-й группы по эталону. Кислотность молока 2-го сорта может быть в пределах 16–20°Т, микробная обсемененность по редуктазной пробе — не ниже 2-го класса и степень чистоты по эталону — не ниже II-й группы. При этом оценка молока при приемке осуществляется по худшему показателю.

Показатели, по которым определяют сорт сдаваемого сырого молока, приведены в таблице 3.

Таблица 3

Показатели сорта молока

Показатели	Норма для молока, сорта			
	высшего	первого	второго	не сортового
Кислотность, °Т	16–18	16–18	16–20	Менее 16 или более 21
Группа чистоты	I	I	II	III
Редуктазная проба	1	1	2	3
Содержание соматических клеток	До 500 тыс.	Выше 500 тыс.	До 1 млн	—
Ингибирующие вещества не допускаются				

Повышенное содержание соматических клеток в молоке свидетельствует о наличии острого воспаления вымени (мастит). Применение молока с повышенным содержанием в нем соматических клеток на пищевые цели не допускается. Кроме потери технологических свойств, такое молоко содержит токсины.

Кислотность молока является показателем, косвенно подтверждающим его микробное благополучие. При повышении количества бактерий в молоке растет и его кислотность. Пониженная кислотность свидетельствует о том, что в молоко добавлены химические вещества

с целью фальсификации его качества. А это опасно, поскольку все вещества, применяемые для фальсификации, токсичны для человека.

В таблице 4 указана периодичность контроля показателей качества молока, поступающего на молочный завод из хозяйств.

Таблица 4

**Периодичность контроля показателей  
качества молока на молзаводе**

<b>Контролируемый показатель</b>	<b>Периодичность контроля</b>	<b>Методы испытаний при повторном контроле, по просьбе поставщика</b>
Органолептические показатели	Ежедневно в каждой партии	ГОСТ 28283-89
Титруемая кислотность, в °Т	Ежедневно в каждой партии	ГОСТ 3624-92
Группа чистоты	Ежедневно в каждой партии	ГОСТ 8218-89
Бактериальная обсемененность, КОЕ/г	Не реже одного раза в 10 дней	ГОСТ 9225-84
Содержание соматических клеток, тыс./мл	Не реже одного раза в 10 дней	ГОСТ 23453-90
Наличие ингибирующих веществ	Не реже одного раза в 10 дней	ГОСТ 23454-79

При обнаружении в молоке ингибирующих веществ его относят к несортовому, если по остальным показателям оно соответствует требованиям. Прием следующей партии молока, поступившей из этого хозяйства, осуществляют только после получения результатов анализа, подтверждающего отсутствие ингибирующих веществ.

При получении неудовлетворительных результатов анализов, хотя бы по одному из показателей, по нему проводят повторный анализ удвоенного объема пробы, взятой из той же партии молока. Результаты повторного

анализа являются окончательными и распространяются на всю партию продукта.

Антибиотики, находящиеся в молоке, подавляют жизнедеятельность очень чувствительных к ним молочнокислых бактерий и тем самым нарушают технологический процесс изготовления кисломолочных продуктов. Поэтому раз в декаду молоко, поступающее из хозяйств, должно быть проверено на наличие антибиотиков и других ингибиторов (перекиси водорода, соды, добавляемых с целью фальсификации качества молока).

О. А. Симецкий указывает сроки разрушения и выведения антибиотиков из организма коровы после последнего введения антибиотика с целью лечения мастита (табл. 5).

Таблица 5

**Сроки использования молока  
после внутримышечного введения коровам антибиотиков**

<b>Антибиотики</b>	<b>Количество, тыс. ед.</b>	<b>Сроки использования после последнего введения (в ч)</b>
Бензилпенициллин	250	6
	500	6
	2000	12
	10 000	12
Бициллин-3	1500	30
Экмоновоциллин	4000	30
Стрептомицин	2000	30
	15 000	48

На качество молока оказывают влияние радиоактивные вещества, гербициды, фунгициды, пестициды и другие ксенобиотики. Молоко с остаточными количествами химических веществ защиты растений и животных, а также антибиотиков подлежит выбраковке.

## 13.6. МИКРОБИОЛОГИЯ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Человеку давно известно, что молоко после получения быстро сквашивается. Но он узнал также, что в кислом молоке не так быстро происходит разложение белка и другие нежелательные изменения, поэтому при обработке молока стали создаваться условия для его сквашивания, что позволяло сохранять продукт в течение нескольких дней. Методы обработки молока у разных народов были различны, в связи с чем получаемые продукты также отличались один от другого. Таким образом возникало большое число кисломолочных продуктов, известных под различными названиями: у осетин — кефир, у русских — простокваша, у татар — катык, у армян — мацун, у украинцев — ряженка, а у народностей, занимающихся коневодством, — кумыс. Все они сквашиваются молочнокислыми бактериями, а в некоторых, кроме этого, одновременно идет и спиртовое брожение, вызванное дрожжами.

Интерес к кисломолочным продуктам возник под влиянием идей и трудов И. И. Мечникова (1907). Он обратил внимание на то, что жители стран Балканского полуострова отличаются особым долголетием. Причину этого он связывал с тем, что жители этих стран регулярно употребляют в пищу большое количество кисломолочных продуктов. По мнению И. И. Мечникова, молочнокислые бактерии, содержащиеся в этих продуктах, способны приживаться в кишечнике человека и благотворно влиять на организм. В толстом отделе кишечника обычную микрофлору составляют гнилостные бактерии, выделяющие индол, скатол, которые, всасываясь через стенки кишечника в кровь, постепенно отравляют организм человека. Ученый пришел к выводу, что гнилостный процесс в кишечнике можно ослабить или совсем заглушить, постоянно употребляя кисломолочные продукты. В результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий образуется молочная кислота и реакция среды кишечника из щелочной становится кислой. В кислой

среде гнилостные бактерии не могут развиваться, поэтому устраняется источник отравления организма. Кроме того, продукты метаболизма молочнокислых бактерий содержат антибиотические вещества (низин), губительные для гнилостных и патогенных микроорганизмов.

Мечниковская теория о продлении жизни стимулировала общественный интерес к кисломолочным продуктам. Также известно, что кисломолочные продукты в диетическом отношении более ценны, чем молоко, и, кроме того, они обладают лечебными свойствами. Усвояемость кисломолочных продуктов повышается также в результате частичной пептонизации белков, т. е. разложения их на более простые вещества. Так, цельное молоко за час усваивается на 32%, а кисломолочные продукты — на 92%. Учитывая этот факт, в детских молочных кухнях кефир предлагают самым маленьким детям как заменитель материнского молока.

Все кисломолочные продукты делят на две группы: продукты молочнокислого брожения — простокваша, ацидофильное молоко, сметана и продукты смешанного молочнокислого и спиртового брожения — кефир, кумыс, катык. Продукты первой группы характеризуются плотным сгустком, а второй — более острым вкусом, нежным сгустком, пронизанным пузырьками углекислого газа, исчезающими при встряхивании.

На молочном заводе все поступившее молоко подвергают обязательной пастеризации, при этом основная масса молочнокислых бактерий погибает, а главное, не могут специалисты молочного дела доверить приготовление кисломолочных продуктов «диким штаммам» молочнокислых бактерий. Для этой цели бактериологи молочного завода приобретают закваски из чистых культур молочнокислых бактерий в производственных лабораториях. На каждую культуру молочнокислых бактерий имеется паспорт, в котором дается полная характеристика микроба: название в латинской транскрипции, морфологические, культуральные, биохимические свойства и предельная кислотообразующая способность в градусах по Тернеру. Молочнокислые закваски выпускают

в двух видах: лиофильно высушенные и жидкие концентрированные, разлитые во флаконы с этикетками.

Сухой бактериальный концентрат используют для приготовления производственной закваски или непосредственно кисломолочного продукта после его активизации. Для приготовления производственной закваски одну порцию (флакон) для активизации вносят в 1 л стерильного молока, а при непосредственном приготовлении кисломолочного продукта вносят содержимое флакона в 6–8 л стерильного молока. При этом мезофильные молочнокислые стрептококки помещают при 30°C, а термофильные — при 40°C в течение 1,5–3 ч для приготовления производственной закваски или 3,5–5 ч для непосредственного приготовления продукта.

При длительном использовании в молочном производстве заквасок, состоящих из одних и тех же культур, в них могут накопиться бактериофаги. Поэтому закваски различных партий следует менять не реже чем один раз в неделю.

### 13.6.1. Продукты молочнокислого брожения

*Домашняя простокваша* — готовят в домашних условиях, в сельской местности, обязательно из сырого молока. Простокваша, видимо, относится к самому древнему кисломолочному продукту, ее название говорит само за себя — «молоко просто сквасилось», в результате жизнедеятельности микроорганизмов, попавших в молоко из соскового канала вымени и молочной посуды. По сути дела, простокваша — это молоко, находящееся в фазе молочнокислых бактерий.

*Мечниковская простокваша* — готовят из пастеризованного и охлажденного до 40°C молока, в которое вносят 5% закваски, состоящей из термофильного молочнокислого стрептококка и болгарской палочки (*Str. thermophilus* и *L. bulgaricum*). Через 4–6 ч молоко свертывается, кислотность продукта достигает 70°Т. Простокваша имеет плотный сгусток, сметанообразную

консистенцию и кислый вкус. Чем выше температура заквашивания, тем больше показатель кислотности продукта.

*Ацидофильная простокваша.* Ее готовят так же, как мечниковскую простоквашу, только закваска состоит из чистой культуры ацидофильной палочки (*Lactobact. acidophilum*). Ацидофильная палочка, в отличие от болгарской, хорошо приживается в желудочно-кишечном тракте животных, т. е. в той среде, которая является естественным местом обитания для нее, поэтому лечебная эффективность такого кисломолочного продукта выше, а его действие более продолжительное.

*Сметана.* В 20–30%-ные пастеризованные при 85°C без выдержки и охлажденные до 22°C сливки вносят 5% закваски, состоящей из молочнокислого и сливочного стрептококков и ароматообразующих бактерий (*Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*). В первые 3 ч сливки нужно перемешивать 2–3 раза, а затем оставить в покое до конца сквашивания, определяемого по кислотности. Сквашенные сливки созревают в помещении с температурой 5–8°C, консистенция созревшей сметаны становится густой вследствие набухания белков и агрегирования жировых шариков. Готовая сметана должна иметь кислотность 85°Т, ее рекомендуют хранить при 4°C.

### 13.6.2. Продукты смешанного брожения

С широко распространенным кисломолочным продуктом — кефиром — связано много легенд. Еще при жизни А. С. Пушкина было известно, что у карачаевцев есть целебный напиток, но как готовится этот напиток, никто не знал. Горцы оберегали секрет приготовления напитка, так как считали, что таинственная сила напитка исчезнет, если о нем узнают неверные.

Первое научное сообщение о кефире было сделано на заседании Кавказского медицинского общества в 1867 г. Вскоре после этого было открыто несколько лечебниц, где основным лекарством был кефир.

**Кефир.** Отличительной особенностью этого продукта является использование кефирных грибков, представляющих собой белые белковые гроздевидные образования диаметром от 2 мм до 3 см. При гистологическом исследовании срезов тела грибков обнаруживали тесные переплетения нитей, которые составляли строму грибка, удерживающую остальные группы микроорганизмов: молочнокислые стрептококки, палочки и молочные дрожжи. По С. Королеву, кефирные грибки представляют собой прочное симбиотическое образование, ведущее себя как единый живой организм, который растет, размножается и передает свои свойства последующим поколениям. Многокомпонентность микробного симбиоза обуславливает трудности получения стабильного и оптимального состава закваски, что является обязательным для выработки стандартного кефира. Любое отклонение от принятого режима культивирования влечет за собой изменение микробного состава закваски, что свидетельствует об исключительной способности кефирных грибков к саморегулированию микрофлоры. Регулируя температуру заквашивания, можно изменить течение вызываемых ими процессов. Культивирование грибков при температуре ниже 15°C способствует активизации спиртового брожения; при более высокой температуре интенсивнее развиваются молочнокислые микроорганизмы, что повышает содержание в продукте молочной кислоты.

**Кумыс** является самым древним молочным напитком в нашей стране. Еще в V в. до н. э. греческий историк Геродот, описывая быт далеких предков — скифов, сообщал, что они умеют делать из молока кобылиц вкусный напиток.

Благодаря своим лечебным свойствам кумыс получил широкую известность. Напитком бодрости, веселья и долголетия называли кумыс в народе. Издавна считалось, что кумыс укрепляет здоровье и особенно полезен для ослабленных людей.

Кобылье молоко резко отличается от коровьего по химическому составу (жира 1,5%, сахара 6,7% и высокое

содержание альбумина, который при воздействии слабых кислот не изменяется), что сказывается на свойствах получаемого продукта. При сквашивании кобыльего молока образуется рыхлый неплотный сгусток с мелкими хлопьями казеина, вот почему сквашенное кобылье молоко остается жидким и не выпадает в осадок.

Готовят кумыс из парного непастеризованного кобыльего молока. В качестве закваски раньше использовали кумыс прежней выработки. В настоящее время на молочных заводах для приготовления кумыса применяют чистые культуры *L. bulgaricum* и дрожжи рода *Torula*. В кобылье молоко вносят 1% закваски, выдерживают при 30°C в течение 6–8 ч, затем разливают по бутылкам, плотно закупоривают и ставят в холодильник для созревания на 2–3 дня. Различают кумыс слабый, содержащий 1% спирта; средний — до 1,75% и крепкий — до 2,5% спирта.

Специалисты много лет разрабатывали способы получения этого целебного напитка из коровьего молока, который обладает такими же высокими питательными и вкусовыми достоинствами. Благодаря жизнедеятельности молочнокислых палочек и дрожжей кумыс из коровьего молока содержит не только спирт и молочную кислоту, но и витамины группы В.

**Бифидобактерин** — новый кисломолочный напиток, готовят с использованием *Bifidobacterium bifidum*. Бифидобактерии относятся к нормальной микрофлоре кишечника молодняка, находящегося на молочном вскармливании. Они хорошо приживаются в естественной среде обитания, поэтому их добавляют в состав микрофлоры пробиотиков, нормализующих микрофлору желудочно-кишечного тракта. Из чистых культур бифидобактерий готовят закваски в сочетании с известными молочнокислыми бактериями, которые используют для приготовления лечебных кисломолочных продуктов, таких как бифидок, бифилукс, бифидумпростокваша, бифидокефир.

В микробиологических лабораториях при молочном заводе регулярно контролируют качество производст-

венной закваски на активность, продолжительность сквашивания, кислотность и бродильный титр. Под микроскопом просматривают не менее 10 полей зрения на чистоту закваски. Проверяют качество сгустка, вкус и запах полученного кисломолочного продукта. Наличие бактерий группы кишечной палочки устанавливают путем посева 10 мл закваски в 50 мл среды Кесслера.

### 13.7. МИКРОБИОЛОГИЯ МАСЛА

Сырьем для получения масла являются 25–35% -ные сливки, которые должны быть свежими, без посторонних запахов и привкусов. Сливки подвергают пастеризации, в результате чего разрушаются некоторые ферменты и погибает до 99,9% микроорганизмов. Пастеризация может быть длительная и кратковременная. Кратковременную пастеризацию проводят при непрерывном движении сливок и нагревании их до 85°C.

После пастеризации сливки охлаждают до 4–6°C, чтобы приостановить развитие оставшейся микрофлоры. При такой температуре происходит физическое созревание сливок: уплотнение жира, повышение вязкости. Масло изготавливают сбиванием сливок в маслоизготовителях, при сбивании жировые шарики сбиваются в масляные зерна, которые отделяют от пахты и обрабатывают. Чем сливки жирнее, тем быстрее они сбиваются, оптимальная температура для сбивания 9–16°C.

Различают два типа сливочного масла: сладкосливочное и кислосливочное. В сладкосливочном масле содержатся микробы, которые остаются после пастеризации сливок, а также попадают во время их созревания и сбивания. На количество микробов влияет температура хранения, чем она выше, тем больше микробов. В 1 г сладкосливочного масла допускается до 10 000 бактерий, при коли-титре 0,1 г. Кислосливочное масло готовят внесением в пастеризованные сливки закваски из *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*, поэтому в 1 г такого ма-

сла содержатся десятки и сотни миллионов молочнокислых микробов, коли-титр такой же — 0,1 г. Обычно микробов больше при длительном (12–16 ч) сквашивании сливок и меньше при кратковременном (20–30 мин). В сладкосливочном масле нежелательных микробов больше, чем в кислосливочном.

Микробы в масло могут попасть из аппаратуры, чистота которой зависит от качества мойки, дезинфекции и чистоты промывной воды. Вода и ее состав оказывают большое влияние на качество масла. Она может быть причиной многих пороков масла.

### 13.7.1. Микробиологические процессы при хранении масла и его пороки

Микроорганизмы, попавшие в масло в течение технологического процесса при нарушении санитарно-гигиенических требований, могут разлагать белки и жиры. В результате жизнедеятельности микроорганизмов в масле появляются следующие изменения.

В результате разложения белков масла протеолитическими ферментами бактерий оно становится горьким. Такой порок появляется в результате длительного хранения сладкосливочного масла при низкой положительной температуре.

*Прогорклый вкус* вызывают плесневые грибы, некоторые виды дрожжей, флуоресцирующие, маслянокислые и другие микробы. Они разлагают жиры на глицерин и жирные кислоты, а маслянокислые бациллы к тому же образуют масляную кислоту. Такой порок появляется при нарушении режима пастеризации.

*Кислый вкус* появляется в масле при нарушении температурного режима и хранении его при температуре выше 10°C в результате сбраживания лактозы молочнокислыми бактериями до молочной кислоты.

*Плесневение* вызывают плесневые грибы *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, являющиеся строгими аэробами. Этот порок появляется при нарушении технологических

процессов, наличии пустот в глубине масла, при плохой герметизации упаковочным материалом. Следовательно, чем плотнее масло и ниже температура хранения, тем меньше условий для развития аэробных микроорганизмов.

Высококачественный продукт можно получить при соблюдении технологии производства масла. Готовое масло хранят при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , при которой происходит полная задержка развития микрофлоры.

### 13.8. МИКРОБИОЛОГИЯ СЫРОДЕЛИЯ

Сыр относится к молочным продуктам и является идеальным белково-жировым концентратом молока. Из 90 различных веществ молока 85% поступают в сыр в тех же пропорциях. Сыр — это молочный продукт, получаемый в результате сычужного свертывания молока, обработке сгустка, его созревания с целью получения продукта со специфическим запахом, консистенцией и вкусом.

Не всякое молоко можно использовать в сыроделии, только молоко высокого качества. Например, швейцарский сыр готовят из молока коров, пасущихся на альпийских лугах, при этом коров нельзя кормить силосом и корнеплодами. Если молоко медленно свертывается или совсем не свертывается, то такое молоко называют сыронепригодным. Причин сыронепригодности молока много, однако этот вопрос еще до конца не изучен.

Микрофлора молока для сыроделия имеет первостепенное значение, так как процесс свертывания молока происходит под влиянием продуктов жизнедеятельности микроорганизмов в сочетании с сычужным ферментом.

Приготовление сыра состоит из следующих этапов:

- 1) подготовка молока;
- 2) получение казеинового сгустка;
- 3) обработка сгустка для удаления влаги;
- 4) формование сыра и прессование;

- 5) посолка сыра;
- 6) созревание сыра.

1. Первый этап начинается с проверки качества молока: не всякое молоко можно использовать в сыроделии — только высокого качества. Для производства сыров используют и сырое, и пастеризованное молоко. При пастеризации погибают микроорганизмы, вызывающие вспучивание сыров, молоко становится стандартным. Однако прогревание молока замедляет процесс свертывания, так как при этом происходит осаждение солей кальция. При использовании пастеризованного молока обязательно вносят чистые культуры молочнокислых бактерий. В состав бактериальных заквасок входят кислотообразователи (*Str. lactis*, *Str. cremoris*), а также микробы, образующие кислоту и ароматические вещества (*Str. diacetylactis*, *Str. paracitrovorum*). Многоштаммовые закваски молочнокислых бактерий лучше приспособляются к непостоянным условиям молочной среды. При использовании сырого молока необходимо изменять технологический процесс, учитывая физико-химические свойства каждой партии. Многое зависит от мастерства сыродела. Молоко, применяемое для производства сыра, должно обладать определенной степенью зрелости, кислотностью 21° по Тернеру, т. е. нельзя использовать парное молоко. Повышение кислотности — главный фактор, ускоряющий и усиливающий стягивание сычужного сгустка и выделение из него сыворотки. Лучше, если молоко по своему микробиологическому состоянию находится на границе между двумя фазами: смешанной и молочнокислой.

2. Молочный сгусток получают двумя методами:

- а) с помощью молочнокислых бактерий при выработке кисломолочных сыров;
- б) с помощью молочнокислых микробов в сочетании с сычужным ферментом (получают из сычугов 2–3-недельных телят) при выработке твердых сыров.

Сычужный фермент в сочетании с молочнокислыми бактериями обладает наибольшей протеолитической активностью. Сычужный фермент разлагает белки молока

до пептонов, ферменты молочнокислых бактерий — до аминокислот. Видимо, в связи с этим усвояемость жиров и белков из сыра достигает 95–97%. Молочный сахар (лактоза) при созревании сыров сбраживается полностью.

В сыроделии применяют главным образом сычужное свертывание молока. Для этого в сырную ванну с подготовленным молоком вносят 0,5% бактериальной закваски и 2,5 г порошка сычужного фермента на 100 л молока, которое должно свернуться при температуре 40°C за 40 мин. От плотности сгустка зависит качество сыра, его выход. Сгусток, полученный из зрелого молока, легче отдает сыворотку, чем из незрелого молока.

3. В сырной ванне, чтобы ускорить и облегчить удаление сыворотки, сгусток разрезают специальным ножом в виде «лиры», при этом должны образоваться сырные зерна величиной 2–5 мм. Основная масса микробов (до 75%) остается в сгустке, остальные выходят с сывороткой.

Твердые сыры должны содержать небольшое количество влаги. Это достигается дроблением сгустка и вторым нагреванием, при этом происходит большее обезвоживание зерна и его уплотнение. Второе нагревание, проводимое при 40–55°C, создает оптимальные условия для развития термофильных палочек. Зерно опускается на дно ванны, и мастер приступает к следующей операции.

4. После формования сырной головки в зависимости от сорта его прессуют. Прессование происходит под давлением вышележащих слоев, это необходимо для закрепления формы, плотного соединения зерен в сплошной монолит и для удаления лишней сыворотки. Чем крупнее сыр, тем продолжительнее удерживается в нем повышенная температура. Прессовать сыр рекомендуется при 18–20°C. Такая температура способствует развитию микроорганизмов, в результате чего их количество достигает нескольких миллиардов в 1 г сырной массы.

5. Посолка сыра проводится с целью улучшения консистенции вследствие набухания казеина, он становится

пластичным, приобретает определенный вкус и аромат. При погружении в ванну с концентрированным раствором натрия хлорида (22–24%) при температуре 8–10°C из поверхностных слоев сыра извлекаются вещества, находящиеся в растворенном состоянии — молочный сахар, соли молочной кислоты, а внутрь — взамен их — проникает соль, которая замедляет развитие не только вредных, но и полезных молочнокислых бактерий. Продолжительность посолки зависит от сорта сыра и длится от 2 до 10 дней.

6. Созревание сыров. Сыры сразу после посолки еще непригодны к употреблению. Созревание и приобретение специфических свойств происходит в подвалах, где сыры переворачивают, регулируют температуру, влажность, т. е. мастер управляет процессом созревания. Сыры выдерживают от 10 дней (закусочные) до 8–10 мес. (швейцарские, твердые). Вкус и запах сыра обуславливают продукты распада белков, молочного сахара и жира, которые образуются под воздействием ферментов молочнокислых бактерий и сычужного фермента. По мере созревания сыров наступает гибель молочнокислых микробов, в начале стрептококков, а затем и палочек.

По прошествии нескольких месяцев в процесс формирования твердых сыров включаются пропионовокислые бактерии, которые сбраживают молочную кислоту до пропионовой и уксусной с выделением диоксида углерода. Газ растворяется в сырной массе и после ее насыщения образует глазки. В эластичной массе сыра глазки имеют правильную форму и придают определенный рисунок различным сортам сыра. При нарушении технологического процесса в сыр попадают БГКП и маслянокислые бактерии, образующие такие газы, которые вызывают появление трещин и рваных глазков. Таким образом, по рисунку на разрезе сыра в какой-то степени можно судить о течении микробиологических процессов.

### 13.8.1. Пороки сыров микробного происхождения

*Сыр без глазков* («слепой» сыр) — этот порок у твердых сыров возникает в результате гибели пропионово-кислых бактерий во время нагревания, т. е. при нарушении режима пастеризации.

*Сыр с большим количеством глубоких глазков* — этот порок появляется в результате неправильного теплового режима в процессе созревания сыра. Большое количество глазков появляется при преждевременном развитии газообразующих бактерий.

*Вспучивание* в начале созревания сыра могут вызвать БГКП, когда в сырной массе содержится еще несброженный молочный сахар. Рисунок сыра на разрезе становится неправильным, рваным. Если этот порок наблюдается в конце процесса созревания, когда уменьшается количество молочнокислых микробов и образуемых ими продуктов, происходит повышение рН среды. В таких условиях могут активизироваться маслянокислые бациллы, споры которых продолжительное время сохраняются в сырной массе. Образуемый бациллами водород и другие газы вызывают вспучивание сыра. Для предупреждения этого порока необходимо применять молоко высокого качества и бактериально чистое.

*Горький вкус* придают продукты жизнедеятельности некоторых маммококков, выделяющих протеолитические ферменты и расщепляющих белки до конечных продуктов. Сырная масса приобретает также прогорклый вкус, если проявили активность маслянокислые бациллы, образующие масляную кислоту.

*Изъязвление корки* вызывает осповидная плесень, которая иногда поражает и подкорковый слой. В образованные пустоты проникают гнилостные микробы, разлагающие сырную массу, которая приобретает мажущую консистенцию и гнилостный запах. Если в пустотах развивается зеленая плесень — пенициллиум, сыр приобретает горький вкус, так как ферменты плесени расщепляют жиры до конечных продуктов.

Для предупреждения появления пороков сыра и получения высококачественных продуктов, необходимо соблюдать технологический процесс, санитарно-гигиенические условия производства, проводить тщательный контроль качества применяемого сырья.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Какие фазы проходит молоко при хранении при 10°C?
2. Назовите основные микроорганизмы, вызывающие порчу молока.
3. Назовите физические методы сохранения молока.
4. Какие продукты молочнокислого брожения вы знаете?
5. Какие типы сливочного масла выделяют?
6. Назовите пороки сыров микробного происхождения.

## ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА КОРМОВ

### 14.1. ЭПИФИТНАЯ МИКРОФЛОРА РАСТЕНИЙ

**П**рикорневая и корневая система растений обсеменена большим количеством различной микрофлоры. В корневой зоне (ризосфере) имеется большое количество отмирающих корневых остатков, являющихся питательным субстратом для сапрофитной почвенной микрофлоры. Эти бактерии относятся к гнилостным, как и некоторые представители кишечной группы, встречающиеся в корневой зоне растений. Кроме них, ризосфера содержит значительное количество гетероферментативных молочнокислых бактерий. Количество спорообразующих становится значительным лишь после отмирания корневой системы. Из плесневых грибов преобладают *Penicillium*, *Fusarium*.

Некоторые бактерии и микроскопические грибы, обитающие у корня, постепенно переходят на наземную часть растущего растения и расселяются на ней. На поверхности растений способна существовать лишь определенная группа микроорганизмов, получившая название эпифитной. На поверхности растений содержатся аммонификаторы, маслянокислые бактерии,

молочнокислые бактерии, бактерии группы кишечной палочки (БГКП) и представители других физиологических групп микроорганизмов. В отличие от других микробов, эпифиты хорошо переносят действие фитонцидов, солнечных излучений и питаются веществами, выделяемыми растениями. Находясь на поверхности растений, эпифиты не повреждают и не проникают в ткани здорового растения. Большая роль в этом процессе принадлежит естественному иммунитету и бактерицидным веществам, которые выделяют растения. Все растения выделяют фитонциды, которые влияют на физиологические процессы микробов.

*Взаимоотношения между микробами и скошенными растениями.* После скашивания растений нарушается проницаемость клеток, разрушаются бактерицидные вещества, которые препятствовали проникновению микробов в их ткани. Активизируются все микроорганизмы, находившиеся на поверхности растений: гнилостные, маслянокислые, молочнокислые бактерии и плесневые грибы и др. Микроорганизмы, и в первую очередь грибы, при интенсивном их развитии снижают качество корма и его питательную ценность. Под действием *Aspergillus*, *Penicillium* изменяются жиры, затем углеводы и белки, в корме накапливаются различные продукты распада, резко изменяющие запах и вкус корма, среди них органические жирные кислоты, аммиак и пептоны. Эти процессы особенно активно протекают при высокой влажности и температуре.

В глубинных слоях корма развиваются анаэробные бактерии, а на поверхности — аэробные бактерии и плесневые грибы. В результате их жизнедеятельности происходит разложение составных частей корма, что приводит к потере питательных веществ и порче корма. Он приобретает гнилостный запах, волокна легко разрываются, их консистенция становится мажущейся. Такой корм плохо поедается животными и может вызвать кормовые отравления.

## 14.2. СЕНО

Сушка — древний и наиболее распространенный способ консервирования зеленой массы и других кормов (зерно, солома). Суть этого процесса заключается в том, что при сушке микробиологические процессы в корме приостанавливаются из-за удаления из него свободной воды, которая составляет большую часть имеющейся в корме влаги. Так, если в свежей траве содержится 70–80% влаги, то в сене всего 12–16%. Оставшаяся в корме вода представляет собой связанную воду и не может поддерживать развитие микроорганизмов. Таким образом, задача сушки — удаление избыточной воды из корма с наименьшей потерей органических веществ. При сушке число жизнедеятельных микроорганизмов, находящихся на поверхности кормов, постепенно уменьшается, но, тем не менее, в них всегда можно найти большее или меньшее число эпифитной и сапрофитной микрофлоры, попавшей из воздуха и почвы. Размножение сапрофитной микрофлоры в результате повышения влажности приводит к заметному повышению температуры. Это повышение температуры, связанное с жизнедеятельностью микроорганизмов, получило название термогенез.

*Приготовление обыкновенного сена.* Сено готовят из скошенных трав, которые имеют влажность 70–80% и содержат большое количество свободной воды. Такая вода создает благоприятные условия для размножения эпифитной микрофлоры, вызывающей гниение травы. Высушивание травы до влажности 12–17% приостанавливает микробиологические процессы, что прекращает разрушение высушенных растений и они сохраняют свои качества длительное время.

После высушивания в сене сохраняется большое количество эпифитной микрофлоры, но так как при этом нет условий для их размножения, то они находятся в анабиотическом состоянии. При попадании воды на высушенное сено деятельность микроорганизмов начинает активизироваться, что приводит к повышению температуры до 40–50°C и выше. При самонагревании расти-

тельной массы происходит четко выраженная смена микрофлоры. Сначала в греющейся массе размножаются мезофильные бактерии. С повышением температуры на смену им приходят термофилы, способные развиваться при температуре до 75–80°C. Обугливание растительной массы начинается с температуры около 90°C, при такой температуре микроорганизмы прекращают свою деятельность, дальнейшие процессы протекают химическим путем. Образуются горючие газы метан и водород, которые адсорбируются на пористой поверхности обуглившихся растений, вследствие чего может произойти самовоспламенение. Воспламенение происходит лишь при наличии воздуха и недостаточно уплотненной растительной массы.

Микроорганизмы используют не всю энергию потребленных ими питательных веществ, избыток энергии выделяется в окружающую среду главным образом в виде тепла. Чем выше температура согреваемого корма, тем ниже его качество. Но не всегда явление термогенеза вредно. В северных районах, где мало тепла и высокая влажность, его используют для приготовления бурого сена.

### **14.3. МИКРОБИОЛОГИЯ СИЛОСОВАНИЯ КОРМОВ**

Термин «силос» (*silos*) очень древнего происхождения, на испанском языке означает «яма» для хранения зерна (в настоящее время утратившее свое первоначальное значение). Такие зернохранилища были распространены во многих местностях побережья Средиземного моря. Еще за 700 лет до н. э. землевладельцы Греции, Турции, Северной Африки широко использовали такие ямы для хранения зерна. Со временем этот принцип был использован для хранения и консервирования зеленой массы.

*Силосование* — сложный микробиологический и биохимический процесс консервирования сочной растительной массы.

Суть силосования заключается в том, что в результате сбраживания растительных углеводов ферментами молочнокислых бактерий в силосуемой массе накапливается молочная кислота, обладающая антимикробными свойствами, в результате чего корм не подвергается гниению и приобретает стойкость при хранении.

Для получения силоса хорошего качества и с наименьшими потерями необходимо создать следующие условия:

1) на поверхности измельченных растений среди эпифитной микрофлоры должны находиться молочнокислые микроорганизмы;

2) использовать для силосования корма, содержащие достаточное количество легкосилосующихся углеводов (кукуруза, подсолнечник, горох, зеленый овес, луговые злаки) или добавлять их в несилосующиеся растения;

3) оптимальную влажность для силосования 65–75%, при которой происходит интенсивное образование органических кислот. При пониженной влажности силосуемая масса плохо уплотняется, в ней много воздуха и создаются условия для самонагревания, развития плесени и гнилостных бактерий;

4) оптимальную температуру для развития молочнокислых бактерий 25–30°C, при этой температуре идет нормальный процесс заквашивания корма с небольшими потерями питательных веществ. Готовый силос получается умеренно кислый, желто-зеленого цвета, с приятным специфическим запахом;

5) хорошо изолировать силосуемую массу от воздуха для создания анаэробных условий, при которых создаются неблагоприятные условия для размножения гнилостных и плесневых микроорганизмов.

### 14.3.1. Биохимизм микробиологических процессов при силосовании

Бактерии, вырабатывающие молочную кислоту, представляют большую разнообразную группу, в которую входят как кокковидные, так и палочковидные формы.

По качеству продуктов брожения молочнокислые бактерии делят на две основные группы.

*Гомоферментативные*, образующие из сбраживаемых ими углеводов в основном молочную кислоту и лишь следы различных побочных продуктов. Типичные представители этой группы — молочнокислые стрептококки и молочнокислые палочки. При таком брожении получается продукт с приятным кислым вкусом и запахом.

*Гетероферментативные*, образующие, кроме молочной кислоты, значительное количество побочных продуктов (этилового спирта, уксусной кислоты, углекислого газа). Среди них также имеются кокковые и палочковидные формы.

Для развития всех молочнокислых бактерий в растительной массе должны быть легкоусвояемые углеводы. Способность вырабатывать молочную кислоту изменяется у одного и того же вида микроорганизмов от многих факторов, в том числе и от качества питательного субстрата. Так, при сбраживании гексоз они образуют в качестве главного продукта молочную кислоту, которая получается в результате расщепления одной молекулы сахара на две молекулы молочной кислоты.

При сбраживании пентоз в конечных продуктах брожения будет всегда больше уксусной кислоты, чем при сбраживании, например, гексоз глюкозы или фруктозы. А так как пентозаны входят в состав растительной массы, наличие в готовом силосе уксусной кислоты также является результатом жизнедеятельности молочнокислых, а не уксуснокислых бактерий. Поэтому даже в хорошем силосе всегда находится определенное количество уксусной кислоты (И. А. Даниленко с соавт., 1972). И если в составе органических кислот будет не менее 65–70% молочной, а уксусной 30–35%, то, значит, бро-

жение происходило правильно. Известны два способа силосования: холодный и горячий.

*Холодный способ* силосования характеризуется тем, что созревание силоса происходит при температуре 25–30°C. При таком силосовании измельченную растительную массу плотно укладывают в траншею, а сверху изолируют от воздуха для создания анаэробных условий, при которых развитие гнилостных бактерий и плесневых грибов подавляется. Непременное условие получения высококачественного корма — быстрая изоляция силосуемой массы от воздуха, поэтому продолжительность заполнения траншеи зеленой массой не должна превышать 3–4 дней. Для предотвращения термогенеза необходимо укладывать измельченную зеленую массу быстро и непрерывно, при постоянном уплотнении.

Процесс силосования можно условно разделить на три фазы.

**Первая фаза** силосования называется *фазой смешанной микрофлоры*. В растительной массе начинается бурное развитие *эпифитной* микрофлоры (гнилостной, молочнокислой, маслянокислой, микроскопических грибов), внесенной с кормом. Продолжительность первой фазы зависит от качества корма, плотности укладки, температуры окружающей среды, но чаще бывает кратковременной.

**Во вторую фазу** — *фазу главного брожения* — основную роль играют молочнокислые бактерии, выделяющие молочную кислоту. При оптимальном содержании сахара в растительной массе интенсивное молочнокислое брожение приводит к образованию значительного количества органических кислот (в основном молочной), которое необходимо для подкисления корма до pH 4,2–4,4 (Н. Г. Макарецв, 1999). В начале этой фазы размножаются кокки, затем, по мере нарастания кислотности, им на смену приходят кислотоустойчивые молочнокислые палочки. Молочная кислота обладает антимикробными свойствами, поэтому большинство гнилостных бактерий погибает, но спорообразующие формы в виде спор могут длительное время сохраняться в силосованном корме.

**Третья фаза** — конечная — связана с постепенным отмиранием возбудителей молочнокислого брожения в созревающем силосе. Молочная кислота при накоплении в большой концентрации становится вредной и для молочнокислых палочек, которые наряду с оставшимися кокками начинают отмирать. Таким образом, количество бактерий в корме уменьшается и процесс силосования подходит к естественному завершению.

## 14.4. СЕНАЖ

Это разновидность консервированного корма, получаемого из провяленных трав, главным образом бобовых, убранных в начале бутонизации.

Научные исследования, проведенные в последние годы, показали, что особенно перспективным способом консервирования различных трав, и в первую очередь клевера и люцерны, является приготовление из них так называемого сенажа.

Технология приготовления сенажа включает скашивание, плющение и закладку провяленной травы в хранилище. Получить доброкачественный сенаж и до минимума сократить его потери при хранении можно только при закладке корма в капитальные хранилища — башни и траншеи. Траншеи по сравнению с башнями более просты и удобны в эксплуатации. Для приготовления высококачественного сенажа в хранилища закладывают мелко измельченные растения (размер частиц 2–3 см), что обеспечивает сыпучесть и уплотнение корма, тщательно утрамбовывают массы и, что очень важно, заготовку сенажа надо провести в 2–4 дня, т. е. в сжатые сроки. Недостаточное уплотнение и продолжительные сроки закладки вызывают нежелательное повышение температуры, что ухудшает перевариваемость и потери органического вещества корма. После загрузки хранилища сенаж укрывают слоем свежескошенной травы, затем полиэтиленовой пленкой и сверху слоем земли и торфа.

От степени герметизации хранилища зависит сохранность и качество сенажа, так как при доступе воздуха начинаются гнилостные процессы, приводящие к порче корма.

В отличие от обычного силоса, сохранность которого обуславливается накоплением органических кислот до рН 4,2–4,4, консервирование сенажа достигается за счет физиологической сухости исходного сырья, сохраняемого в анаэробных условиях. Если влажность консервируемой массы будет в пределах 40–50%, то она хорошо ферментируется и даже при дефиците углеводов дает корм высокого качества. При этом рН корма может быть довольно высоким — около 5. Это объясняется тем, что гнилостные бактерии обладают меньшим осмотическим давлением, чем молочнокислые бактерии. При подсушивании корма в нем приостанавливаются гнилостные процессы, но продолжают действовать возбудители молочнокислого брожения. На этом основано приготовление сенажа, когда несколько подсушенную массу закладывают в специальную траншею, как при холодном силосовании.

Сенаж по своим свойствам ближе к зеленой массе, чем обычный силос. Это пресный корм, его кислотность соответствует величине рН 4,8–5, в нем почти полностью сохраняется сахар, в то время как у силоса он весь используется и превращается в органические кислоты.

При указанной влажности растений интенсивно развиваться может лишь плесень. Плесени являются строгими аэробами, поэтому непременное условие приготовления сенажа — надежная изоляция его от воздуха. Оставшийся в консервируемой массе воздух быстро поглощается на дыхание еще живыми клетками растений, и все свободное пространство между частями измельченного корма заполняется углекислым газом.

Таким образом, для приготовления сенажа хорошего качества необходимо выполнить следующие условия:

1) на поверхности измельченных растений среди эпифитной микрофлоры должны находиться молочнокислые микроорганизмы;

2) снизить влажность растений до 45–55% ;

3) создать анаэробные условия для размножения молочнокислых бактерий, чтобы предотвратить развитие гнилостных бактерий и плесневых грибов.

Тем не менее технология приготовления сенажа основана не только на физических, но и на микробиологических процессах, которые протекают медленнее, чем в силосе. В силосе максимальное количество микроорганизмов накапливается уже к 7-му дню, а в сенаже их численность достигает максимума только на 15-й день, т. е. молочнокислое брожение в сенаже протекает значительно слабее, чем при силосовании и зависит от влажности и вида консервируемого сырья. Поэтому показатель рН в сенаже выше, чем в силосе и колеблется от 4,4 до 5,6. По данным А. А. Зубрилина с соавторами (1967), количество молочнокислых микробов в сенаже в 4–5 раз меньше, чем в силосе. В связи с этим в сенаже по сравнению с силосом содержится больше неиспользованного сахара. Так, если в силосе весь сахар превращается в органические кислоты, то в сенаже сохраняется около 80% сахара. В результате создания неблагоприятных условий для развития микрофлоры в консервируемом корме, исключения утечки сока и механических потерь листьев и соцветий при заготовке и хранении сенажа общие потери питательных веществ в сенаже не превышают 13–17%. Таким образом, сенаж совмещает в себе положительные качества сена и силоса.

В отличие от силоса, сенаж, имея низкую влажность, не замерзает, что упрощает его выгрузку и скармливание животным. Сенаж можно заготавливать из всех трав, так как, в отличие от силоса, не имеет значения, сколько в траве содержится легкображиваемых углеводов и к какой группе по силосуемости относятся эти растения.

## 14.5. ВОЗБУДИТЕЛИ ПОРЧИ КОРМОВ

В состав эпифитной микрофлоры растительного сырья входят различные микроорганизмы (микроскопические грибы, кишечная палочка, маслянокислые бактерии), которые при нарушении технологического процесса могут активизироваться и вызывать нежелательные процессы, а также порчу кормов.

### Плесневые грибы

Молочная кислота, образующаяся при силосовании кормов, не угнетает развитие плесневых грибов, они хорошо переносят кислую среду (рН до 1,2) и активно размножаются в силосе при плохой изоляции от воздуха, т. е. при нарушении технологического процесса. Для своей жизнедеятельности они используют углеводы, а при их недостатке — молочную и уксусную кислоты. При этом значительно ухудшается качество силоса и отмечается токсическое воздействие заплесневелого корма на организм животного. Надежными мерами для предотвращения развития плесневых грибов в силосе являются хорошая герметизация силосохранилищ и создание благоприятных условий для развития молочнокислого брожения.

### Бактерии группы кишечной палочки (БГКП)

Бактерии группы кишечной палочки (БГКП) являются гетероферментативными микроорганизмами, которые, кроме сахаролитических, выделяют и протеолитические ферменты, расщепляющие растительные белки до аммиака, таким образом снижая ценность силосуемого корма.

Нежелательны для процесса силосования и **маслянокислые бактерии**, являющиеся строгими анаэробами.

В процессе жизнедеятельности они используют сахар, молочную кислоту, некоторые аминокислоты. Это сопровождается гнилостным распадом белка, накоплением масляной кислоты и других, вредных для организма животных побочных продуктов. Наличие масляной кислоты является индикатором гнилостного разложения белка при слабом нарастании в силосе молочной кислоты. Снижение рН среды до 4,2 предотвращает развитие маслянокислого брожения при силосовании кормов. Для предотвращения маслянокислого брожения необходимо строго соблюдать правила технологического процесса, не допускать загрязнения силосуемой массы землей, трупами грызунов и т. д.

## 14.6. ДРОЖЖЕВАНИЕ КОРМОВ

Это микробиологический метод подготовки кормов к скармливанию. В химическом составе дрожжей содержится 48–52% белков, 13–16% углеводов, 2–3% жиров, 22–40% безазотистых экстрактивных веществ и 6–10% золы. В состав дрожжей входят многие незаменимые аминокислоты: аргинин, гистидин, лизин, лейцин, тирозин, треонин, фенилаланин, метионин, валин, триптофан, которых мало в кормах растительного происхождения. В дрожжах много витаминов группы В, провитамина D<sub>2</sub>, а также витамины Е, С и др. И, в отличие от других источников белка, они обладают большой скоростью размножения и нетребовательны к качеству источников питательных веществ. Применение дрожжей не случайно, например, 500 кг дрожжей дают за сутки 80 кг белков, а у быка того же веса суточный привес составляет в лучшем случае 500 г белка.

При дрожжевании кормов необходимо создать благоприятные условия для размножения дрожжевых клеток:

- 1) наличие легкображиваемых углеводов, содержащих моно- или дисахариды;

2) достаточную аэрацию (иначе дрожжи перейдут на анаэробный тип дыхания, конечным продуктом которого является этиловый спирт);

3) благоприятную температуру 25–30°C;

4) рН в пределах 3,8–4,2.

Для дрожжевания хорошо подходят кормовые смеси, приготовленные из отходов зернового производства, корнеплодов, жома, к которым примешивают грубые корма, т. е. смеси, богатые углеводами и бедные протеином (исключить корма животного происхождения, на которых развиваются гнилостные, маслянокислые и другие нежелательные микроорганизмы).

Для дрожжевания кормов необходимо подобрать сухое и светлое помещение, чтобы предотвратить загрязнение дрожжеванного корма спорами плесневых грибов, среди которых могут быть возбудители микотоксикозов.

Существуют три способа дрожжевания кормов: безопарный, опарный и заквасочный.

*Безопарный* способ характеризуется тем, что 1% разведенных дрожжей вносят сразу во всю массу корма. Смесь регулярно перемешивают для аэрирования в течение 8–10 ч, затем корм готов к скармливанию.

При *опарном* способе вначале готовят опару: для этого дрожжи (1% от массы корма) разводят и смешивают с одной пятой корма, выдерживают 6 ч при перемешивании. Затем в опару добавляют остальной корм, двойное количество воды и процесс дрожжевания идет еще 3 ч при постоянном перемешивании для доступа воздуха.

*Заквасочный* способ применяют при недостаточном количестве дрожжей, поэтому вначале готовят закваску. Для этого 0,5 кг прессованных дрожжей размножают в небольшом количестве хорошо дрожжающихся углеводистых кормов (отходы зернового производства) при 30–35°C, через 5 ч их можно использовать как закваску. Заготовленную порцию корма ослаживают, обливая их кипятком, — ослаживание происходит в течение 5 ч при температуре не ниже 60°C. К осоложенному корму добавляют такое же количество воды и половину закваски, перемешивают и оставляют на 6 ч в теплом месте,

после чего корм готов к скармливанию. Вторую часть оставшейся закваски можно использовать 5–10 раз для дрожжевания новых партий корма, после чего она теряет активность.

Дрожжевание кормов улучшает качество корма и обогащает корм белками, витаминами, а присутствие молочной кислоты увеличивает у животных аппетит.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Назовите представителей эпифитной микрофлоры растений.
2. Какой физиологический процесс лежит в основе приготовления и хранения сена?
3. На какие группы делят молочнокислые бактерии по качеству продуктов брожения?
4. В чем заключается технология приготовления сенажа?
5. Какие существуют способы дрожжевания кормов?

## **МИКРОФЛОРА КОЖЕВЕННО-МЕХОВОГО СЫРЬЯ**

**Ш**кура состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки. Внутренний слой кожи после съемки с животного называется мездриной стороной (мездрой). Парная, только что снятая с животного кожа содержит до 70% воды, белковые вещества, жиры и минеральные вещества. Таким образом, в состав парной кожи входят все вещества, необходимые для питания микроорганизмов.

### **15.1. МИКРОФЛОРА ПАРНОЙ ШКУРЫ**

На шерстном покрове кожи всегда множество различных микроорганизмов. Свежая мездра бывает стерильная, на ее поверхность микробы попадают во время съемки и обработки кожи. Источником микрофлоры парной кожи являются навоз, почва, вода, воздух, она загрязняется с инструментов и рук, с поверхности применяемого оборудования. На парной коже сразу после убоя обнаруживаются кишечная палочка, стафилококки, гнилостные бактерии, протей и дрожжи и т. д.

Состав микроорганизмов, находящихся на коже, очень разнообразен: обнаруживаются кишечная палочка, стафилококки, гнилостные бактерии, протей, плесневые грибы, дрожжи и актиномицеты, обладающие широким набором ферментативных свойств. Начало разложения тканей можно заметить по изменению цвета, консистенции и гнилостному запаху.

*Гнилостное разложение* протекает в три стадии. Первая стадия характеризуется быстрым размножением бактерий в подкожной клетчатке с последующим проникновением их в слой эпидермиса и волосяные сумки. На этой стадии видимых изменений нет. Во второй стадии микробы проникают в глубь кожи. При этом мездра ослизняется и темнеет, шерстный покров легко выпадает. В третьей стадии ткань дермы разлагается, становится ослизлой и дряблой, эпидермис легко отслаивается. Шкура теряет прочность, легко разрывается и издает сильный гнилостный запах (сероводорода, аммиака).

В начале гнилостного процесса на поверхности кожи преобладают аэробные аммонификаторы (*Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megaterium* и др.), а по мере продвижения в толщу кожи можно обнаружить анаэробы *Cl. putrificum*, *Cl. sporogenum*.

*Плесневение* шкур происходит при хранении их в сырых прохладных помещениях. На поверхности влажной мездры появляются пигментированные колонии плесневых грибов, которые быстро заражают все сырье. Протеолитические ферменты психрофильных бактерий и плесневых грибов разрушают мездру, в результате чего снижается товарная ценность сырья.

## 15.2. КОНСЕРВИРОВАНИЕ КОЖЕВЕННОГО СЫРЬЯ

Шкуры, поступающие на промышленную переработку, должны сохранять первоначальную структуру. Такими они остаются только в том случае, если сразу после охлаждения, не позднее чем через 3–4 ч после съема, их консервируют. Существует много способов консервирования и все они направлены на то, чтобы предотвратить развитие микробов.

*Соление* — самый распространенный способ консервирования кожевенного сырья. Хлорид натрия повышает осмотическое давление и создает неблагоприятные условия для развития микробов. Соление может быть мокрым и соленым.

*Мокросоленое консервирование* проводят путем засолки шкур врасстил или комбинированно — с предварительным тузлукованием. При солении врасстил на стеллаже с приподнятым центром шкуру расстилают мездрой вверх. После этого ее обильно посыпают солью и натирают, на первую шкуру расстилают вторую, которую натирают солью и так далее до образования штабеля высотой 1–1,5 м. Шкуры в таком штабеле выдерживают 5–7 дней.

Тузлукование характеризуется тем, что вначале шкуры пропитывают крепким раствором поваренной соли, а затем подсаливают и выдерживают в штабелях. Тузлукуют хорошо промытые парные или размороженные шкуры, которые загружают в чан с 25,6%-ным раствором хлорида натрия мездрой вверх. Шкуры выдерживают в чане от 10 до 20 ч в зависимости от их размеров, после этого их извлекают, оставляют на 2 ч и солят в расстил. Тузлучный раствор используют не более 5 раз, для усиления антимикробных свойств в раствор добавляют кремнисто-фтористый натрий из расчета 0,75 г на 1 л.

*Сухосоленое консервирование* чаще применяется в южных регионах и на отгонных пастбищах. Свежие шкуры солят, складывают в штабеля и выдерживают трое суток, затем сушат мездрой вверх.

*Пресно-сухое консервирование* применяют для обработки мелких шкур. Сушку проводят обязательно под навесом или в специальных сушилках. Сушка на солнце вызывает их ороговение. В процессе сушки происходит обезвоживание шкуры, влажность снижается до 15%, что приостанавливает жизнедеятельность микробов.

*Замораживание.* Низкая температура подавляет жизнедеятельность микробов, ферментативные процессы и тем самым сохраняет парную шкуру. Резкое колебание температуры, повторное замораживание и оттаивание приводят к быстрой порче сырья. В результате появляются пороки, снижающие товарную ценность шкур.

### 15.3. МИКРОФЛОРА ШЕРСТИ

На поверхности шерсти имеется большое количество бактерий, попавших из почвы, навоза. Наиболее активными разрушителями шерсти являются *Bac. mesentericus*,

*Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, из микроскопических грибов — аспергиллы и пенициллы, которые вызывают процесс аммонификации кератина, что приводит к разрушению волокна. Степень изменения шерсти зависит не только от вида микробов, но и от других факторов, таких как температура и влажность окружающей среды. Сырая шерсть под действием термофильных бактерий теряет блеск, цвет, эластичность, а при активной аэрации нагревается и даже воспламеняется. В прелой шерсти уменьшается прочность волокон, а под действием *Pseudomonas* происходит изменение цвета шерсти. Для предотвращения развития микробиологических процессов и порчи шерсти ее надо хранить в тюках, на деревянных брусках в сухих и хорошо проветриваемых помещениях.

**Кожевенно-меховое сырье как возможный источник инфекции.** Кожевенно-меховое сырье, полученное от больных животных, может служить источником возбудителей инфекционных болезней. При контакте человека с таким сырьем происходит его заражение. Особенно опасно сырье, обсемененное возбудителями, образующими споры, которые длительное время сохраняются во внешней среде. Шкуры, от вынужденно забитых животных, обязательно должны быть проверены на сибирскую язву при помощи реакции преципитации (реакции Асколи). Сырье от больных животных тщательно дезинфицируют или уничтожают, если есть подозрение на наличие возбудителя сибирской язвы, эмфизематозного карбункула или других особо опасных возбудителей. Для предотвращения распространения возбудителей через кожевенно-меховое сырье необходимо соблюдать ветеринарно-санитарные правила на складах и предприятиях по его обработке.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите виды микроорганизмов, принимающих участие в микробном разложении кожевенного сырья.
2. Назовите, на чем основаны методы консервирования кожевенного сырья.
3. Назовите источники микробного загрязнения кожевенно-мехового сырья.

## ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

**С**ельскохозяйственные отходы представляют собой излишки сельскохозяйственной продукции, неиспользуемые эффективно. Рециркуляция, повторная переработка и использование отходов в положительном смысле открывают возможность возвращения их к полезному применению в противоположность традиционным методам удаления и перемещения отходов.

Решение проблемы загрязнения окружающей среды отходами сельского хозяйства должно быть направлено на выполнение двух основных задач: предотвращение и исключение загрязнения окружающей среды и эффективное использование вторично переработанных отходов сельскохозяйственного производства. Отходы сельского хозяйства необходимо рассматривать как источник сырья, использование которого экономически и экологически целесообразно.

Отходы промышленности изучены достаточно подробно, разработаны способы и технологии их утилизации и переработки в полезные продукты. Раньше отходы сельского хозяйства не были удостоены внимания технологов. Старые технологии утилизации отходов животноводства и растениеводства убыточны, так как возросла стоимость энергоносителей, а возможности технологии часто не отвечают современным требованиям сельского хозяйства.

Сельскохозяйственные отходы можно разделить на классы: отходы растениеводства, животноводства и перерабатывающих производств. Каждый класс отходов требует специфических технологий переработки и завершения технологических циклов. Например, эффективность переработки отходов животноводства зависит от химического состава, физических свойств, видов животных, которые определяют качество готового переработанного продукта. Современные технологии утилизации отходов животноводства позволяют расширить спектр программных продуктов и материалов, необходимых человеку. В таком случае сельскохозяйственные отходы будут разделены на *коммерчески значимые* — отходы, конечный продукт переработки которых имеет высокие потребительские свойства и востребован, и *экологически значимые* — отходы, переработка которых необходима и целесообразна с экологических позиций.

Значительное внимание привлекает использование различных целлюлозосодержащих отходов АПК (агропромышленного комплекса) как сырья для получения белковой кормовой массы. Для этих целей используют способность микробов синтезировать белок.

Следует отметить, что ежегодно мировой запас отходов накапливает более 9 млн т отрубей злаковых культур, до 1 млн т виноградных выжимок, более 1,3 млн т отходов картофеле-крахмальных заводов, до 800 тыс. т вторичных продуктов консервных заводов, а также громадные трудноучитываемые отходы плодоовощных баз. Отходы плодов и овощей, семена и кожуру томатов можно высушить и использовать в рационах животных, равно как листовую обертку или листья, стержень кукурузных початков и их обрезки. Твердые отходы от консервирования гороха, кукурузы и других овощей, фильтрованные из жидких отходов, перерабатывают в сухой корм и используют для скота.

Объем отходов в животноводстве в 5 раз больше объема всех бытовых отходов сельского хозяйства. Животноводческие отходы характеризуются высоким содержанием органических веществ, минеральных соединений

азота, фосфора, калия и т. д. В США в 1,72 млрд т навоза содержится около 20% непереработанных питательных веществ. Лишь одна треть этого количества навоза содержит столько белка, сколько дает ежегодный урожай соевых бобов. Рециркуляция, повторная переработка и использование отходов в положительном смысле открывают возможность возвращения их полезному применению в противоположность традиционным методам удаления и перемещения отходов.

Биотрансформация отходов производства пищевых продуктов с получением микробной биомассы является важнейшей задачей биотехнологии. Этот процесс может предупредить или резко снизить потери сельскохозяйственного сырья и сделать пищевую промышленность безотходной или хотя бы малоотходной.

Отходы, все еще имеющиеся в пищевой промышленности, обладают определенной питательной ценностью и могут использоваться как кормовые добавки в рационах сельскохозяйственных животных.

Современная биотехнология предлагает три основные возможности конверсии целлюлозы и крахмалсодержащих материалов в белковые препараты:

1) отходы подвергают действию эндо- и экзоферментов при прямом культивировании микроорганизмов на углеродсодержащем растительном сырье для получения различных продуктов;

2) кислотный и ферментативный гидролиз целлюлозы с получением сахаросодержащих растворов, на которых возможно выращивание дрожжевой биомассы (белок);

3) биоконверсия углеводородсодержащих отходов в биомассу через этанол и органические кислоты.

Наиболее рациональной технологией получения микробного белка на вторичном растительном сырье является биотрансформация сырья с помощью микроорганизмов, имеющих короткую лаг-фазу, продуцирующих гидролитические ферменты и поэтому способных утилизировать разнообразное сырье с трудноусваиваемыми полисахаридами.

В производстве микробной массы и белка имеются два перспективных направления: производство их в глубинных культурах и на жидких питательных средах и твердофазная ферментация растительного сырья. Как первое, так второе направление используется в практике биотрансформации растительного сырья.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Какие возможности дает повторная переработка и использование отходов сельского хозяйства?
2. На какие классы можно разделить сельскохозяйственные отходы?

## **РАЗДЕЛ II**

### **ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ**



# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ

**Цель занятия.** Ознакомить студентов с устройством бактериологической лаборатории кафедры, ее оборудованием и правилами техники безопасности. Изучить устройство светового микроскопа и освоить методику микроскопии окрашенных бактериальных препаратов на предметном стекле с применением иммерсионной системы. Ознакомиться с основными формами бактерий под микроскопом.

**Материалы и оборудование.** Комплект микроскопов, люминесцентные лампы для освещения, иммерсионное масло, папки с набором готовых окрашенных препаратов, приготовленных из микроорганизмов различной морфологии.

**Таблицы.** Ход лучей в сухой и иммерсионной системе. Основные формы бактерий.

## **Техника безопасности в микробиологической лаборатории**

1. Заходить и работать в лаборатории можно только в спецодежде.
2. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты питания.
3. За каждым студентом закрепляется рабочее место и микроскоп.

4. Без разрешения преподавателя нельзя включать электроприборы.

5. Студент должен поставить в известность преподавателя при загрязнении предметов окружающей среды инфицированным материалом для немедленной дезинфекции.

6. После окончания работы весь исследуемый материал, использованные бактериальные культуры, инструменты поместить в биксы для стерилизации и отдать преподавателю.

7. При уходе из лаборатории необходимо снять спецодежду, тщательно вымыть руки, при необходимости руки обработать дезраствором.

8. Каждый студент должен расписаться в специальном журнале о знании правил техники безопасности.

### **Оборудование микробиологической лаборатории**

Каждая бактериологическая лаборатория должна быть оснащена следующим оборудованием.

*Микроскопы* — оптические, люминесцентные, осветительные приборы.

*Термостаты* — в них автоматически поддерживается температура, оптимальная для выращивания микроорганизмов в диапазоне от 28 до 43°C.

Электрический *сушильный шкаф* и *автоклав* предназначены для стерилизации лабораторной посуды, питательных сред и спецодежды.

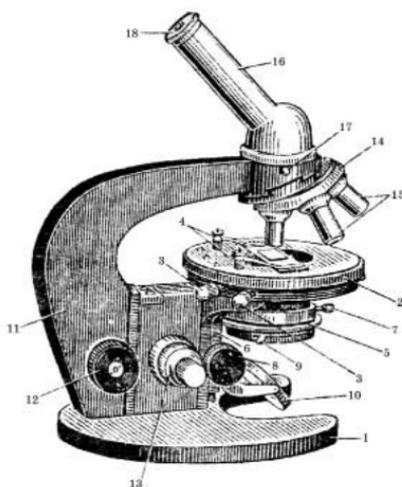
*Холодильники* и *морозильные камеры* используют для хранения питательных сред, музейных бактериальных культур, биопрепаратов, а также исследуемого материала.

*Центрифуги* предназначены для осаждения микроорганизмов, эритроцитов, для отделения прозрачного экстракта из исследуемого продукта. *Дистиллятор* — для получения дистиллированной воды, на которой готовят физиологический раствор, питательные среды, рабочие растворы красок; автоматические водяные бани, аналитические и торзионные весы, колба Бунзена с вмонтированным фильтром Зейтца, керамические фильтры Шамберлена, Беркефельда и вакуумный насос.

*Лабораторная посуда* — колбы, бактериологические, серологические и уленгутовские пробирки, чашки Петри, автоматические пипетки, стеклянные градуированные и пастеровские пипетки, мерные цилиндры. Мелкие металлические инструменты: бактериологические петли, пинцеты, скальпели, ножницы.

## 1.1. СВЕТОЙ МИКРОСКОП, ЕГО УСТРОЙСТВО И ПРАВИЛА РАБОТЫ

Оптические микроскопы позволяют исследовать микроорганизмы в проходящем свете. Такие микроскопы состоят из механической и оптической частей (рис. 2).



**Рис. 2**  
Микроскоп МБР-1:

- 1 — основание микроскопа; 2 — предметный столик; 3 — винты для перемещения предметного столика; 4 — клеммы, прижимающие препарат; 5 — конденсор; 6 — кронштейн конденсора; 7 — винт, укрепляющий конденсор в гильзе; 8 — рукоятка перемещения конденсора; 9 — рукоятка ирисовой диафрагмы конденсора; 10 — зеркало; 11 — тубусодержатель; 12 — макрометрический винт; 13 — микрометрический винт; 14 — револьверное устройство для объективов; 15 — объективы; 16 — наклонный тубус; 17 — винт для крепления тубуса; 18 — окуляр.

Механическая часть включает штатив с предметным столиком (2) и тубус (16). Предметный столик с помощью винтов может перемещаться в горизонтальной плоскости. Он имеет две клеммы, прижимающие предметное стекло к столику. Тубусодержатель (11) может перемещаться с помощью макро- (12) и микровинта (13), предназначенных соответственно для грубой и точной фокусировки изучаемого объекта. Микровинт относится к наиболее уязвимым деталям микроскопа, поэтому с ним нужно обращаться особенно осторожно. Полный оборот микровинта поднимает или опускает тубус на 0,1 мм.

В верхней части тубусодержателя находится револьверное устройство, вращающееся вокруг своей оси (14), в отверстия которого ввинчены объективы (15). В верхний конец тубуса вставляется окуляр (18).

Оптическая часть состоит из объективов, окуляров и осветительного аппарата.

Окуляр вставляется в верхний конец тубуса. Он состоит из двух линз в оправе, между которыми помещена диафрагма. На окуляре имеются цифровые обозначения ( $\times 7$ ,  $\times 10$ ,  $\times 15$ ), показывающие степень увеличения изображения.

Объективы представляют собой системы оптических линз. Только одна линза — фронтальная — выполняет функцию увеличения, остальные корректирующие. На объективах имеются обозначения, показывающие увеличение, даваемое объективом:

- $\times 8$  — объектив применяют для наведения света и поиска объекта;
- $\times 40$  — объектив применяют для изучения микроскопических грибов, дрожжей и подвижности бактерий в препарате «висячая капля»;
- $\times 90$  — объектив применяют для изучения бактерий под иммерсией.

Объективы, дающие увеличение в 8 и 40 раз, называются сухими, так как при работе с ними между объективом и препаратом находится слой воздуха, коэффициент преломления которого равен 1,0, а коэффициент преломления стекла равен 1,52. Из-за этой разницы часть

боковых лучей преломляется и отклоняется, не попадая в объектив, но освещение при этом не ухудшается, так как диаметр линз  $\times 8$  и  $\times 40$  объективов достаточно велик.

Иммерсионным называется объектив, при работе с которым между препаратом и объективом помещают каплю иммерсионного масла. Иммерсионное масло имеет оптический коэффициент преломления (1,51), близкий к коэффициенту преломления стекла, благодаря этому световые лучи, проходя через однородную среду, не отклоняются от своего направления, попадают на линзу объектива и создают хорошее освещение.

В рассматриваемом микроскопе объектив с увеличением в  $\times 90$  раз является иммерсионным. Иммерсионный объектив применяется при изучении бактерий.

Общее увеличение, которое дает микроскоп, равняется произведению степени увеличения объектива на показатель окуляра. В учебном процессе удобнее применять 10 кратный окуляр, дающий оптимальный обзор поля зрения. Следовательно, при изучении под иммерсионным объективом микроорганизмы будут увеличены в 900 раз.

Четкость получаемого изображения зависит от разрешающей способности микроскопа — способности различно рассматривать две близко расположенные точки, расстояние между которыми равно половине длины световой волны. Рассматриваемый нами микроскоп имеет разрешающую способность около 0,2–0,3 мкм. Из этого следует, что микроорганизмы величиной менее 0,2 мкм в данном микроскопе **не видны**.

Осветительный аппарат состоит из конденсора (5), зеркала (10) и присовой диафрагмы. Осветительный аппарат предназначен для наилучшего освещения объекта. С помощью зеркала лучи света, исходящие от источника света, направляются в конденсор, концентрирующий лучи в своем фокусе. Поверхность зеркала с одной стороны плоская, с другой — вогнутая. При естественном освещении лучше применять вогнутую поверхность зеркала, при искусственном освещении (осветитель) — плоскую.

Конденсор с ирисовой диафрагмой представляет собой систему оптических линз и служит для концентрации отраженных зеркалом лучей света. При опускании конденсора при помощи винта (7) поле зрения несколько затемняется, при поднятии — освещается. Ирисовая диафрагма помещается под конденсором, служит для регулирования потока света, которое осуществляется с помощью рычажка — расширением или сужением диаметра отверстия, пропускающего свет к конденсору.

Выпускаются также дополнительные приспособления, которые позволяют максимально использовать все возможности микроскопа и значительно расширяют диапазон применения: фазово-контрастные приспособления, осветители, окуляр-микрометр и объектив-микрометр для измерения размеров микроорганизмов.

### **Правила работы со световым микроскопом**

1. Установить наилучшее освещение поля зрения микроскопа, для этого необходимо:

- поставить объектив  $\times 8$  на высоте 1 см от уровня предметного столика;
- поднять конденсор до уровня предметного столика;
- направить плоское зеркало в сторону осветителя.

2. Установить препарат на предметном столике, закрепив клеммами.

3. Нанести каплю иммерсионного масла в центр препарата.

4. Заменить объектив  $\times 8$  на  $\times 90$ .

5. Визуально контролируя, осторожно опустить объектив  $\times 90$  в масло.

6. Наблюдая в окуляр, медленно поднимать объектив до появления какого-либо изображения.

7. Установить четкое изображение с помощью микровинта, вращая его на пол-оборота в ту или иную сторону.

После окончания работы привести микроскоп в порядок:

- 1) поднять макровинтом тубус микроскопа;
- 2) убрать препарат;

3) снять салфеткой масло с  $\times 90$  объектива и установить  $\times 8$  объектив;

4) опустить конденсор;

5) положить салфетку под объектив и опустить тубус микроскопа.

## 1.2. ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ

Форма бактерий — первый таксономический признак, который учитывается при идентификации. По форме клеток бактерии подразделяются на шаровидные (кокки), палочковидные и извитые.

**Кокки.** Имеют форму правильного шара, эллипса, боба и ланцета. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают несколько видов бактерий.

*Микрококки* делятся в разных плоскостях и располагаются одиночно или беспорядочно. Относятся к сапрофитам, обитают в почве, воде и воздухе.

*Стафилококки* делятся в трех взаимноперпендикулярных плоскостях, поэтому располагаются гроздьями, беспорядочно. Среди них встречаются патогенные и условно патогенные бактерии, такие как *Staph. aureus*.

*Диплококки* образуют парно соединенные кокки.

*Стрептококки* — кокки, расположенные в виде цепочки. Среди патогенных встречаются возбудители мита лошадей, скарлатины. В молочной промышленности имеют значение молочнокислые стрептококки, применяющиеся для приготовления кисломолочных продуктов.

*Тетракокки* — кокки, располагающиеся по четыре, большинство сапрофиты

*Сарцины* — кокки, образующие правильные пакеты по 8–16 клеток.

**Палочковидные бактерии.** Это самая большая группа прокариот, которая делится на две группы: палочки, не образующие споры, — истинные бактерии и образующие споры — бациллы. Палочки, у которых диаметр

споры превышает ширину вегетативной клетки, называют клостридиями.

**Извитые бактерии.** Среди этих бактерий различают три основных вида.

*Вибрионы* — бактерии, тело которых представляет неполный завиток в виде запятой (холерный вибрион).

*Спириллы* — бактерии, тело которых состоит из нескольких крупных завитков.

*Спирохеты* — тело которых состоит из множества плотно уложенных завитков вокруг центральной осевой нити, невидимых в световой микроскоп (возбудители лептоспироза, сифилиса).

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Ознакомиться с лабораторией кафедры микробиологии, техникой безопасности и расписаться в журнале техники безопасности.

2. Изучить устройство микроскопа и освоить правила работы с ним.

3. Изучить микрокартину готовых окрашенных препаратов с применением иммерсионной системы микроскопа. Обратит внимание на различные формы бактерий, микрокартину зарисовать.

4. В ходе работы уяснить значение конденсора, диафрагмы и других частей осветительного аппарата. С этой целью провести микроскопию: с опущенным конденсором, с поднятым конденсором, с прикрытой диафрагмой.

5. Освоить правила работы с иммерсионной системой микроскопа. Провести микроскопию препарата, применить  $\times 90$  объектив с иммерсионным маслом и без масла.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Перечислите основные правила техники безопасности при работе в бактериологической лаборатории и боксе.
2. С какой целью применяется световой микроскоп?
3. В чем заключается разница в ходе лучей в сухой и иммерсионной системах микроскопа?
4. При изучении каких микроорганизмов применяется иммерсионная система микроскопа?
5. С какой целью применяется иммерсионное масло?
6. Назовите основные формы бактерий.

## БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ КРАСКИ

**Цель занятия.** Ознакомиться с основными бактериологическими красками. Овладеть методикой приготовления мазка-препарата и окрашивания его простым методом. Овладеть сложными методами окрашивания — окраска по Граму.

**Материалы и оборудование.** Набор сухих бактериологических красок в заводской упаковке. Набор рабочих растворов красок во флаконах — для простого метода окрашивания: метиленовая синь, разведенный фуксин; набор красок для окраски по Граму, спиртовки, предметные стекла; сенная палочка в сенном настое или непатогенная кишечная палочка в МПБ; бактериологические петли, банки с дезраствором, спички; пробирки со смесью взвеси кишечной палочки и стафилококка в физрастворе для окраски по Граму; комплект микроскопов, иммерсионное масло.

**Таблицы.** Основные формы бактерий. Микрофлора зубного налета. Окраска по Граму.

### Исследуемый материал в бактериологии

1. В санитарной бактериологии — продукты животного происхождения и продукты питания: молоко, мясо, консервы, яйца, рыба и т. д.

2. В ветеринарной и медицинской микробиологии: для прижизненной диагностики — кровь, гной, выделения; для посмертной диагностики — кусочки паренхиматозных органов.

Все работы ведутся в условиях бокса над пламенем спиртовки, чтобы исключить загрязнение исследуемого материала и окружающей среды. Исследуемый материал берут в объеме бактериологической петли и наносят на предметное стекло, которое должно быть чистым и обезжиренным. Капля воды, нанесенная на хорошо обезжиренное стекло, растекается равномерно, на плохо обезжиренном — собирается в капельки.

## 2.1. ВИДЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ КРАСОК

Оптическая плотность неокрашенных бактерий незначительно отличается от оптической плотности стекла, поэтому при изучении морфологии бактерий под микроскопом для повышения контрастности их окрашивают анилиновыми красками.

Анилиновые краски плохо растворяются в воде, поэтому вначале готовят насыщенные спиртовые растворы красок (1:10), из которых затем готовят рабочие водные растворы. В некоторые растворы красок добавляют щелочь, карболовую кислоту (фенол) для повышения проницаемости красок в клеточную стенку бактерий. В бактериологической практике чаще применяют следующие краски.

*Щелочная метиленовая синь* — применяют для простого метода окрашивания, она всегда должна находиться на столе у бактериолога.

*Карболовый основной фуксин Циля* — концентрированная краска применяется при окрашивании трудно прокрашивающихся бактерий, таких как возбудитель туберкулеза, споры бактерий (краска красного цвета).

*Разведенный фуксин* — это фуксин Циля, разведенный дистиллированной водой 1:10, применяется для простого метода окрашивания или как один из компонентов окраски по Граму. Краску готовят перед применением, используют в течение одного рабочего дня.

*Карболовый генцианвиолет* — применяют как основной краситель при окраске по Граму.

Методика приготовления препарата для микроскопии состоит из нескольких этапов.

**1. Приготовление мазка.** Для этого на предметном стекле с обратной стороны карандашом по стеклу обводят круг диаметром 2–3 см. Жидкий исследуемый материал берут петлей и распределяют на предметном стекле в области круга, а микробную культуру с поверхности плотной питательной среды снимают бактериальной петлей и растирают на предметном стекле в капле заранее нанесенной воды. Из кусочков паренхиматозных органов делают мазки-отпечатки (местом свежего среза прикасаются к предметному стеклу, делая несколько отпечатков). Обязательное условие — мазок должен быть **тонким**.

**2. Высушивание мазка** — на воздухе при комнатной температуре, для ускорения можно сушить в потоке теплого воздуха высоко над спиртовкой.

**3. Фиксация мазка** — преследует две цели: прикрепить бактерии к предметному стеклу и убить их, так как убитые микробы лучше окрашиваются (а заодно и обезопасить бактериолога, так как среди исследуемых бактерий могут быть и патогенные). Фиксацию мазков проводят одним из двух способов: физическим или химическим.

*Физический* метод фиксации заключается в медленном трехкратном проведении предметного стекла с мазком через наиболее горячую часть пламени в общей сложности 2–3 с, в зависимости от толщины стекла (держат мазком вверх!). Если стекло при прикосновении к руке горячее, значит, цель достигнута — микробы убиты. Не следует перегревать мазок, иначе произойдет деформация формы клеток.

При *химическом* методе фиксации препарат-отпечаток погружают в метиловый спирт на 5 мин или в смесь равных объемов спирта и эфира на 10–15 мин. Этот метод фиксации мягкий и щадящий, рекомендуют применять для препаратов, приготовленных из крови или паренхиматозных органов, а также из сметаны и сливочного масла, так как эфир обезжиривает препарат.

**4. Окраска мазка** — простым или сложным методом.

## 2.2. ПРОСТОЙ МЕТОД ОКРАШИВАНИЯ

При простом методе окрашивания применяется одна краска. Этот метод позволяет установить наличие или отсутствие бактерий в исследуемом материале, а также изучить их морфологию (форму, взаиморасположение). Поэтому любой мазок вначале окрашивают простым методом.

В качестве исследуемого материала на лабораторном занятии можно использовать взвесь чистой культуры кишечной палочки, стафилококка, находящейся в пробирке, или свой зубной налет, взятый спичкой и распределенный на предметном стекле. Приготовление препарата из зубного налета и изучение его под микроскопом очень интересно и полезно. Студенты, впервые знакомясь с нормальной микрофлорой зубного налета, увидев такую массу микробов, испытывают шок, стыд и желание уничтожить их. Только изучив полный курс микробиологии, они поймут, что нормальная микрофлора имеет защитное значение, а если ее уничтожить, поселятся микроорганизмы, несвойственные для этой полости (например, дрожжи, вызывающие кандидамикоз-молочницу). В микрофлоре зубного налета здорового человека должны быть представлены все морфологические группы бактерий, т. е. микрофлора зубного налета должна быть обязательно полиморфной: микрококки, стрептококки, стафилококки, извитые и нитевидные формы, молочнокислые палочки, дрожжи и т. д. Приготовление препарата из зубного налета и изучение его — это еще и дань памяти «первому охотнику за микробами» Антонио Ван Левенгуку, который первым заглянул в этот невидимый мир, описал его и воскликнул: «Боже мой, да их больше, чем людей во всем Английском королевстве» (1695).

Методика простого окрашивания заключается в том, что на фиксированный мазок наносят одну краску, 3–5 капель:

- а) щелочную метиленовую синь — на 5 мин;
- б) разведенный фуксин — на 3 мин.

Затем краску смывают водой, препарат высушивают фильтровальной бумагой и наносят на него одну каплю иммерсионного масла, после чего изучают под микроскопом.

Морфология бактерий — **первый** признак, который изучают для определения вида микроорганизмов.

### 2.3. СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ

Сложные методы окрашивания позволяют установить наличие спор, капсул и внутриклеточных включений. Различные виды бактерии имеют разный химический состав и отличаются по строению клеточной стенки, поэтому неодинаково воспринимают окрашивание анилиновыми красками. Отношение микроорганизмов к различным красителям называют *тинкториальными свойствами*. По отношению к различным красителям все бактерии разделены на две группы: грамположительные и грамотрицательные.

Методика окрашивания **по Граму** состоит в следующем.

1. На фиксированный мазок накладывают сухой кусочек фильтровальной бумаги (1×1 см), заранее пропитанный раствором генцианвиолета (в модификации по А. В. Синеву) и наносят 2–3 капли воды на 2 мин. Все бактерии независимо от вида окрашиваются в фиолетовый цвет. Затем фильтровальную бумагу с генцианвиолетом удаляют.

2. Наносят несколько капель раствора Люголя (в этом растворе имеют значение ионы йода) на 2 мин, затем раствор стряхивают. С ионами йода только грамположительные бактерии образуют прочный комплекс.

3. Наносят несколько раз строго в центр мазка этиловый спирт 96° — в результате обесцвечивания происходит дифференциация, только грамотрицательные бактерии обесцвечиваются. Этот этап очень важный, поэтому предметное стекло лучше держать в руках, а не на мостике, чтобы спирт не стекал в уголок стекла. Через 40–50 с спирт смыть водой.

4. Обесцвеченные бактерии дополнительно окрашивают разведенным фуксином — 3 мин, затем краску смывают водой. Препарат высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют под иммерсионным объективом.

**Микрокартина:** грамположительные бактерии окрашены в фиолетовый, а грамотрицательные — в розовый цвет.

Суть окрашивания по Граму заключается в том, что компоненты грамположительных бактерий образуют прочный комплекс с генцианвиолетом в присутствии ионов йода, который при воздействии спиртом не вымывается через узкие поры в толстом слое пептидогликана, поэтому бактерии остаются фиолетовыми. Грамотрицательные бактерии имеют другой химический состав и строение клеточной стенки, поэтому при действии спиртом генцианвиолет вымывается через широкие поры в клеточной стенке, бактерии обесцвечиваются, принимают цвет дополнительного красителя и становятся красными.

**Примечание:** шаровидные бактерии почти всегда грамположительные, бациллы и клостридии в молодой культуре всегда грамположительные, бактерии кишечного-тифозного семейства и извитые формы — грамотрицательные.

Отношение бактерий к окраске по Граму является **вторым** признаком для определения вида бактерий.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Приготовить мазок из зубного налета и окрасить простым методом — разведенным фуксином или метиленовой синью.

2. Приготовить мазок из бактериальной культуры и окрасить простым методом — разведенным фуксином или метиленовой синью.

3. Сравнить оба мазка, обратить внимание на разные формы бактерий, зарисовать микрокартину.

4. Приготовить препарат на предметном стекле из смеси кишечной палочки и стафилококка для окраски по Граму.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите анилиновые краски, часто применяемые в микробиологии.

2. Что характерно для простого метода окрашивания?

3. Суть физического и химического методов фиксации препаратов.

4. Назовите основные формы бактерий.

5. С какой целью изучают морфологию бактерий?

6. С какой целью применяются сложные методы окрашивания?

7. В чем заключается суть окраски по Граму?

8. С какой целью применяется окраска по Граму?

9. Приведите в качестве примера грамположительные бактерии.

## **БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ СПОР И КАПСУЛ. МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ СПОР И КАПСУЛ**

**Цель занятия.** Узнать биологическое значение образования спор и капсул. Овладеть методами окрашивания спор и капсул. Овладеть методами исследования бактерий на подвижность и методами приготовления препаратов «висячая капля» и «раздавленная капля».

**Материалы и оборудование.** Смыв 2–3-суточной культуры сенной палочки, содержащей вегетативные клетки и споры. Набор красок с пипетками для окраски спор по Златогорову; 16–18-часовая культура сенной палочки или кишечной палочки в МПБ для изучения подвижности. Спиртовки, предметные стекла, покровные стекла и стекла с луночкой для изучения подвижности, баночки с вазелином и спичкой. Банки с дезраствором. Микроскопы, иммерсионное масло. Готовый препарат на предметном стекле для демонстрации капсул.

**Таблицы.** Окраска спор по Златогорову. Окраска капсул по Ольту. Органы движения бактерий.

### 3.1. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ СПОР

Некоторые виды палочковидных бактерий в неблагоприятных условиях внутри материнской клетки образуют споры (эндоспоры). Неблагоприятными условиями для бактерий являются:

- недостаток влаги и питательных веществ;
- избыток продуктов метаболизма;
- старение бактериальной культуры.

Споры чаще образуют почвенные микроорганизмы, поэтому почва является резервуаром спорообразующих бактерий и источником загрязнения продуктов животного происхождения (*Bac. anthracis*, *Bac. subtilis*, *Cl. perfringens*). У бактерий в стадии споры прекращаются все физиологические процессы, она находится в состоянии анабиоза. При изменении условий появления пищи и влаги активизируются ферменты и спора прорастает в вегетативную форму, для которой характерны все физиологические формы проявления жизнедеятельности: питание, дыхание и размножение.

Одна бактерия образует только одну спору, т. е. это не размножение, а сохранение вида в неблагоприятных условиях. Все бактерии, образующие споры, называются *бациллы*. Палочки, у которых диаметр спор превышает ширину вегетативной клетки, принято называть *клубридиями*. *Бациллы* бесконечно долго сохраняются в почве (возбудитель сибирской язвы), устойчивы при обработке кислотами и щелочами, выдерживают кипячение (возбудители столбняка, ботулизма), имеют плотную, труднопроницаемую для красителей оболочку и простым методом не прокрашиваются, оставаясь в виде бесцветных включений. Поэтому для окраски спор применяют сложные методы окрашивания, основанные на применении *горячих концентрированных красок*, при этом споры и вегетативные клетки одновременно окрашиваются в один цвет, но при последующем кратковременном воздействии кислотой на мазок вегетативные клетки обесцвечиваются, а споры, являясь

кислотоустойчивыми, сохраняют цвет первой краски. Обесцвеченные вегетативные клетки дополнительно окрашивают.

Методика окрашивания спор по Златогорову.

1. На фиксированный мазок наносят карболовый фуксин и красят 7–10 мин при подогревании над пламенем спиртовки до появления пара, т. е. прокрашивают споры концентрированной горячей краской.

2. Препарат обесцвечивают 2%-ным раствором серной кислоты в течение 1–3 с (за это время должны успеть обесцветиться только вегетативные клетки, поэтому для успешной окраски время обесцвечивания желательно предварительно оттитровать).

3. Препарат обильно промывают водой, чтобы преградить действие кислоты.

4. Обесцвеченные вегетативные клетки докрашивают метиленовой синью 5 мин, краску смывают водой.

**Микрокартина:** споры остались красные, вегетативные клетки — синие.

Наличие или отсутствие споры является **третьим** признаком при определении вида.

## 3.2. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КАПСУЛ

Некоторые болезнетворные бактерии, находясь в организме больного, вокруг клеточной стенки образуют слизистый слой, называемый капсулой, которая имеет консистенцию геля и при микроскопии не видна. Наличие капсулы отмечают у возбудителей сибирской язвы, диплококковой септицемии. У вирулентных бактерий, находящихся в организме животного или человека, капсула является фактором агрессии, так как защищает бактерии от воздействия фагоцитов и специфических антител, поэтому заболевание протекает особенно тяжело. У почвенных бактерий капсула во внешней среде защищает от высыхания и бактериофагов. Среди молоч-

нокислых бактерий имеются штаммы, образующие капсулу, благодаря чему продукт приобретает слизистую, тягучую консистенцию, эта особенность должна быть отражена в названии штамма. У различных бактерий химический состав капсул различен, что позволяет дифференцировать их друг от друга при идентификации. Так, капсульное вещество сибиреязвенной палочки содержит полипептид D-глутаминовой кислоты, а диплококковой септицемии — полисахарид. Капсула бактерий плохо прокрашивается или окрашивается в другой цвет.

Для выявления капсул применяют метод окрашивания по Ольту. Мазок можно приготовить из крови больного животного или из кисломолочного продукта, содержащего слизистые штаммы бактерий.

**Методика.** На мазок наносят 2% -ный водный раствор сафранина и красят 2 мин при подогревании в пламени спиртовки, не допуская кипения красителя, краску смывают водой.

**Микрокартина:** капсула — желтая, тело бактерии — красное.

Наличие или отсутствие капсулы является **четвертым** признаком при определении вида.

### 3.3. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЙ НА ПОДВИЖНОСТЬ

Некоторые бактерии имеют органы движения — жгутики, тончайшие нити диаметром 0,02–0,04 мкм, длиной до 10–20 мкм. Под световым микроскопом жгутики не видны, так как их размеры лежат за пределами разрешающей способности микроскопа, их наличие можно определить косвенным путем — бактерии изучают в живом состоянии: если они передвигаются, значит, у них есть органы движения. Для детального изучения органов движения применяют электронный микроскоп. Наличие и расположение жгутиков можно изучить под световым микроскопом, применив импрегнацию серебром, т. е.

искусственно увеличив размеры жгутиков до разрешающей способности данного микроскопа.

По расположению жгутиков на теле микробной клетки их можно разделить на четыре группы:

- 1) монотрихи — бактерии с одним жгутиком на конце;
- 2) лофотрихи — бактерии с пучком жгутиков на одном конце;
- 3) амфотрихи — бактерии с пучком жгутиков на обоих концах;
- 4) перитрихи — бактерии со жгутиками по всей поверхности тел.

Извитые формы (спириллы и спирохеты) передвигаются в окружающем пространстве за счет изменения конфигурации тела.

### **3.3.1. Методика определения подвижности бактерий в препаратах «висячая капля» и «раздавленная капля»**

Для приготовления препарата «висячая капля», используют молодую 16–18-часовую бульонную культуру изучаемых бактерий (сенная палочка, кишечная палочка), смазывают вазелином края лунки на специальном предметном стекле с луночкой и наносят каплю взвеси в центр покровного стекла. Предметное стекло переворачивают лункой вниз и накладывают на покровное стекло так, чтобы оно прилипло, а капля оказалась в центре лунки. Затем его осторожно еще раз переворачивают покровным стеклом вверх, чтобы капля висела в центре герметично закрытой лунки. При микроскопии под 8-кратным объективом находят край капли, фиксируют предметное стекло клеммами и переводят 40-кратный объектив в рабочее положение (в дальнейшем можно применить и иммерсионный). Для более контрастного изображения надо затемнить поле зрения, прикрыв диафрагму, выбрать оптимальную высоту конденсора, поднимая и опуская его. Подвижность хорошо видна уже при 40-кратном увеличении, при активном движении с помощью жгутиков бактерии пересекают все поле зре-

ния. Старая по возрасту культура малоподвижна, при внимательном изучении можно заметить активность только некоторых клеток.

Для приготовления препарата «раздавленная капля» в центр обычного предметного стекла наносят каплю исследуемой культуры, которую накрывают покровным стеклом. Изучают такой препарат так же, как вышеописанный.

Наличие жгутиков является **пятым** признаком для определения вида.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Приготовить препарат из спорообразующих бактерий, окрасить по Златогорову, изучить под микроскопом, обратить внимание на дифференциацию спор от вегетативных клеток по цвету (можно окрасить *Bac. subtilis* — сенную палочку из сенного настоя).

2. Провести микроскопию готового препарата, приготовленного из культуры капсулообразующих бактерий (например, слизистый штамм молочнокислых бактерий), обратить внимание на наличие капсулы.

3. Овладеть методом приготовления препарата «висячая капля» или «раздавленная капля» из сенного настоя.

4. Провести микроскопию препаратов «висячая капля» или «раздавленная капля» и изучить подвижность под 8- и 40-кратном объективах с прикрытой диафрагмой и опущенным конденсором.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Какое биологическое значение имеют споры в устойчивости бактерий при неблагоприятных условиях?

2. Какое биологическое значение имеют капсулы бактерий, находящихся в организме?

3. На чем основан принцип окрашивания спор?
4. В чем заключается суть окрашивания капсул?
5. С какой целью выявляют наличие спор и капсул у бактерий?
6. На чем основаны косвенные методы определения наличия органов движения у бактерий?
7. На чем основаны прямые методы обнаружения жгутиков у бактерий?
8. Нарисуйте характер расположения жгутиков у различных видов бактерий.
9. С какой целью изучают наличие жгутиков у бактерий?

## **ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ**

**Цель занятия.** Получить представление о назначении обычных, специальных, дифференциально-диагностических и элективных питательных сред. Овладеть методами приготовления питательных сред. Ознакомиться с методами стерилизации, применяемыми в микробиологической практике (электрическим сушильным шкафом, автоклавом).

**Материалы и оборудование.** Автоклав, электрический сушильный шкаф, текучепаровой аппарат Коха, стерилизатор с набором инструментов, твердые фильтры из белой глины, фильтры из нитроцеллюлозы, фильтр Зейтца.

Компоненты для приготовления питательных сред — сухой агар-агар, пептон, поваренная соль, желатин. Набор готовых питательных сред в пробирках, чашках. Образцы сухих питательных сред в фабричной упаковке. Лабораторные весы, разновески, химические стаканы, мензурки, колбы с дистиллированной водой, электроплитка.

**Таблицы.** Классификация питательных сред. Методы стерилизации.

## 4.1. ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

В микробиологических лабораториях готовят питательные среды для выращивания микроорганизмов с учетом их физиологических потребностей. Ко всем питательным средам предъявляются общие требования:

- 1) питательные среды должны быть стерильными;
- 2) питательные среды должны быть влажные, так как микроорганизмы питаются поверхностью тела путем осмоса и диффузии, а продукты метаболизма выделяются только в растворенном виде;
- 3) для большинства бактерий благоприятной является рН в пределах 7,2–7,4;
- 4) питательные среды должны содержать все питательные вещества, источники углерода и азота (пептон), обеспечивающие оптимальный рост;
- 5) некоторые питательные среды должны быть прозрачные;
- 6) для анаэробных бактерий готовят питательные среды, изолированные от воздуха слоем вазелинового масла.

Питательные среды можно разделить по трем признакам.

По составу они делятся на *естественные* и *синтетические*.

В состав естественных сред входят компоненты растительного (экстракты овощные, гороховые) и животного происхождения (экстракты из мяса, сыворотка крови, кровь, яйца, молоко). Из этой группы сред широко применяются МПБ (мясопептонный бульон), МПА (мясопептонный агар).

Синтетическими называют среды, в состав которых вводят физиологически обоснованные количества химически чистых элементов, углеводов, незаменимых аминокислот, витамины, различные минеральные вещества. При изучении метаболических потребностей микроорганизмов в питательные среды вводят радиоактивно меченые углерод и фосфор.

**По физическим свойствам** среды делятся на:

- жидкие (МПБ);
- плотные (МПА);
- полужидкие;
- сухие (имеют вид порошка, находятся в фабричной упаковке, из которого готовят жидкие и плотные питательные среды).

**По назначению** питательные среды делятся на:

- обычные (общеупотребительные);
- специальные;
- дифференциально-диагностические;
- селективные (накопительные, избирательные).

#### **4.1.1. Обычные питательные среды**

К обычным питательным средам относятся МПБ, МПА, и МПЖ. На них растут многие нетребовательные микроорганизмы — кишечная палочка, стафилококки, возбудитель сибирской язвы.

Основой многих питательных сред является мясная вода. Методику приготовления *мясной воды*, являющейся основой многих питательных сред, мы приводим далее для полноты сведений.

Говядину хорошего качества освобождают от костей, жира, измельчают в мясорубке. Один килограмм полученного фарша заливают 2 л водопроводной воды, кипятят 60 мин (можно предварительно экстрагировать в условиях холодильника 16–18 ч, потом кипятить). Далее мясную воду охлаждают, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доливают воду до первоначального объема и разливают по колбам. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при 120°C 20 мин в автоклаве. Перед применением мясную воду разливают в пробирки по 4 мл, вновь стерилизуют и используют для посева бактерий. В мясной воде содержится большое количество аминокислот, углеводов, факторов роста, минеральных солей и экстрактивных веществ.

**МПБ** — *мясопептонный бульон*. К 1 л мясной воды добавляют 10 г пептона (1%) и 5 г (0,5%) химически чистой поваренной соли, устанавливают рН среды 7,6. Разливают в колбы, пробирки и автоклавируют при 120°C 20 мин. Стерильная среда прозрачная, имеет интенсивно-желтый цвет.

**МПА** — *мясопептонный агар*. К 1 л МПБ добавляют 2–3% сухого агар-агара, расплавляют в кипящей водяной бане, разливают в пробирки по 5 мл для приготовления скошенного агара или по 15 мл столбиком для разлива в чашки Петри, затем 20–30 мин автоклавируют при 1 атм. Плотность этой среды сохраняется и при температуре термостата.

Внедрение плотных питательных сред в бактериологию в свое время оказалось очень важным шагом для получения чистых культур микроорганизмов. Стали применять уплотнители, используемые в кондитерском производстве при изготовлении мармелада и желе. В качестве уплотнителя применяют агар-агар, получаемый из некоторых морских водорослей. Агар-агар — это полисахарид, не имеющий питательных свойств, но придающий питательной среде **полужидкую** консистенцию при добавлении 0,5% и **плотную** консистенцию — при добавлении 2%. Для нужд микробиологии промышленность выпускает агар-агар в виде порошка или в виде тонких прозрачных пластинок.

**МПЖ** — *мясопептонный желатин*. Желатин — продукт выварки костей, хрящей и сухожилий, обладающий питательными свойствами. Желатин выпускают предприятия биологической промышленности в виде порошка. Для приготовления МПЖ к одному литру МПБ добавляют 10% порошка желатины, после набухания крупинки колбу ставят в кипящую водяную баню для расплавления и разливают по пробиркам. МПЖ после охлаждения принимает плотную консистенцию при комнатной температуре.

Особенностью этой среды является то, что выращивание бактерий на этой среде возможно только при комнатной температуре, так как в термостате она расплавляется

(разжижается). Температура плавления желатины 27°C, застывает он при температуре 18–20°C, образуя плотный гель. МПЖ применяют для изучения протеолитических свойств бактерий. Под действием протеолитических ферментов, выделяемых бактериями, МПЖ необратимо разжижается.

#### 4.1.2. Специальные питательные среды

Некоторые микроорганизмы при первичном выделении из исследуемого материала очень требовательны к качеству питательных сред. Поэтому для их культивирования применяют специальные среды, в состав которых добавляют углеводы, кровь, сыворотку крови, некоторые незаменимые аминокислоты.

**Сахарный МПБ и МПА.** Чтобы приготовить сахарный агар, к обычным средам добавляют 1% глюкозы, разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром дробно.

**Сывороточный МПБ и МПА.** К МПБ добавляют 5–10% стерильной сыворотки крови и разливают по пробиркам. МПА предварительно расплавляют, охлаждают до 50°C и стерильно добавляют 5–10% сыворотки крови, тщательно перемешивают. Полученную среду разливают в чашки Петри, пробирки и охлаждают.

**Кровяной МПА.** К расплавленному и охлажденному до 50°C МПА, разлитому в чашки Петри, стерильно прибавляют 5–10% дефибринированной крови (кролика, барана).

Сывороточные и кровяные среды готовят непосредственно перед посевом, так как повторно расплавлять среды нельзя.

*Среды обогащения* применяют для подрачивания возбудителя, когда предполагается незначительное обсеменение исследуемого материала, например сальмонеллами. После появления видимого роста в средах обогащения делают пересев из них в дифференциально-диагностические среды.

### 4.1.3. Дифференциально-диагностические среды

Их применяют для первичного выделения возбудителя из исследуемого материала. При приготовлении дифференциально-диагностических сред к обычной среде добавляют углеводы, индикаторы, а к некоторым — ингибиторы и антибиотики. При размножении микроорганизмов в дифференциально-диагностических средах происходит изменение цвета индикатора, питательной среды, самих колоний, что позволяет отличить одни виды бактерий от других (среды Гисса, агар Эндо, Левина, Плоскирева и т. д.).

#### **Среды для индикации бактерий группы кишечных палочек (БГКП)**

**Среда Хейфеца** — выпускается в сухом виде. В состав, кроме основных питательных компонентов (вода, пептон, маннит, натрия хлорид), входят розоловая кислота, раствор метиленового синего. Готовая среда *красно-фиолетового* цвета, при росте кишечной палочки рН сдвигается в кислую сторону и среда приобретает *зеленоватую* окраску

**ХБ (хинозол-бромкрезол-пурпурная среда).** В 1 л воды растворяют 10 г пептона, 5 г хлорида натрия, 5 г маннита. Приготовленную смесь кипятят 15–20 мин, устанавливают рН 7,4–7,6, фильтруют через бумажный фильтр, фильтрат кипятят 10 мин, охлаждают до 60°C, после чего прибавляют 30 мл дрожжевого диализата, 15 мл желчи, 10 мл раствора хинозола и 10 мл 1,6% -ного спиртового раствора бромкрезола пурпурного. Среду разливают в стерильные пробирки по 7–8 мл. При росте БГКП эта среда окрашивается в желтый цвет.

**Среда Кесслера.** К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 50 мл бычьей желчи. Смесь кипятят на водяной бане при помешивании 20–30 мин, фильтруют через вату, добавляют 2,5 г

лактозы, доводят объем дистиллированной воды до 1000 мл, устанавливают рН 7,4–7,6, добавляют 2 мл 1% -ного водного раствора генцианвиолета, разливают в пробирки с поплавками по 8–10 мл и стерилизуют при температуре 121°C в течение 10 мин. Готовая среда имеет темно-фиолетовый цвет. Желчь и генцианвиолет являются ингибиторами грамположительных бактерий, подавляя их размножение, облегчают индикацию кишечной палочки. Помутнение среды и появление газа в поплавках свидетельствуют о наличии кишечной палочки.

**Среды Гисса.** Эти жидкие или полужидкие питательные среды применяют для изучения сахаролитических свойств бактерий. Основой этих сред служит 1%-ная пептонная вода, к которой добавляют 0,5% хлорида натрия и 0,5% одного из углеводов (глюкоза, лактоза, сахароза, маннит) и индикатор Андраде (готовая среда желтого цвета) или индикатор бромтимоловый синий (сине-зеленого цвета). Готовую среду разливают в пробирки по 5–6 мл. В пробирки с жидкой средой помещают «поплавки» для улавливания газа; в полужидких средах при наличии фермента, расщепляющего углеводы до конечных продуктов, появляются пузырьки газа в глубине среды.

**Среда Эндо.** Выпускается в сухом виде. В ее состав входят МПА, 1% лактозы и фуксин, обесцвеченный сульфидом натрия, готовая среда бесцветная. Эта среда применяется для дифференциации БГКП от сальмонелл. Только кишечная палочка расщепляет лактозу, входящую в состав агара Эндо до молочной кислоты, которая восстанавливает обесцвеченный фуксин. Колонии эшерихий в кислой среде приобретают красный цвет с металлическим блеском, а сальмонеллы, не расщепляющие лактозу, образуют бесцветные, неокрашенные колонии, что позволяет дифференцировать их друг от друга.

**Среда Левина.** Выпускается в сухом виде. В ее состав входят также МПА, 2% лактозы, а в качестве ин-

дикатора — эозин с метиленовым синим. Готовая среда красно-фиолетового цвета. Бактерии эшерихии, расщепляющие лактозу, на этой среде образуют колонии, окрашенные в темно-фиолетовый цвет, а сальмонеллы — бесцветные.

**Агар Плоскирева.** Выпускается в сухом виде. Предназначен для выделения сальмонелл, содержит лактозу и компоненты, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры, т. е. ингибиторы (желчные соли, цитрат натрия, тиосульфат натрия, бриллиантовый зеленый, йод, нейтральный красный). Готовая среда оранжево-красная, колонии сальмонелл бесцветные, а эшерихии — кирпично-красного цвета. Агар Плоскирева по классификации является дифференциально-диагностической и селективной средой, поэтому его рекомендуют применять при обильном обсеменении исследуемого материала сопутствующей микрофлорой.

#### 4.1.4. Селективные среды

Селективные (накопительные, элективные) среды разнообразные и очень сложные по своему составу, могут быть плотными и жидкими. Эти питательные среды рекомендуют применять для накопления и выделения возбудителя из исследуемого материала, обильно обсемененного посторонней микрофлорой. В них добавляют ингибиторы (анилиновые краски, желчь, антибиотики), подавляющие рост сопутствующей микрофлоры, обеспечивающие преимущественные условия для размножения выделяемого возбудителя. Жидкие селективные среды в научной литературе называют средами *обогащения*, или *накопления*, их рекомендуют применять, когда в исследуемом материале предполагается незначительное содержание возбудителя и надо увеличить численность выделяемого микроба и подавить размножение нежелательной микрофлоры.

**Среды для индикации (выявления) сальмонелл**

**Магниева среда** состоит из трех растворов.

1.

- Пептон — 4,2;
- натрия хлорид — 7;
- дрожжевой экстракт — 20 мл;
- калий фосфорнокислый однозамещенный (безводный)  $\text{KН}_2\text{PO}_4$  — 1,5 г;
- вода дистиллированная — 890 мл.

Все перечисленные компоненты кипятят и прибавляют растворы 2-й и 3-й.

2.

- Хлористый или сернокислый магниевый кристаллический — 36 г;
- вода дистиллированная — 90 мл.

3.

- 0,1% -ный водный раствор бриллиантового зеленого — 5 мл.

Смесь растворов соединяют и стерилизуют при температуре 121°C в течение 30 мин.

**Селенитовая среда (Ф-бульон)** состоит из двух растворов.

1.

- Натрий фосфорнокислый однозамещенный (безводный)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  — 3 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный (безводный)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 7 г;
- пептон (чешский, венгерский) — 5 г;
- лактоза — 4 г;
- вода дистиллированная — 1000 мл.

pH раствора 6,8–7,1, стерилизуют при температуре 121°C 30 мин.

2.

- Натрий селенистокислый ( $\text{NaHFeO}_3$ ) без примеси теллура — 10 г;
- вода дистиллированная стерильная — 100 мл.

Стерилизация не требуется. Раствор можно хранить в холодильнике 1–2 мес.

Для получения рабочей среды непосредственно перед посевом к 100 мл раствора первого добавляют 4 мл раствора второго. Готовая среда имеет рН 7, готовую среду не хранят.

**Среда Клиглера** готовится из сухой питательной среды.

**Трехсахарный агар** с мочевиной по Олькеницкому.

- 1,5%-ный рыбо- или мясопептонный агар, рН 7,2 — 100 мл;
- лактоза — 1 г;
- сахароза — 1 г;
- глюкоза — 0,1 г;
- мочевина — 1 г;
- соль Мора ( $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) — 0,02 г;
- натрия тиосульфат — 0,03 г;
- 0,4%-ный водный раствор фенолового красного (фенолрота) — 0,4 мл.

Все ингредиенты, кроме фенолрота, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды (10 мл) на водяной бане. Затем вливают в расплавленный агар, фильтруют, доводят до рН 7,2–7,4.

После этого добавляют фенолрот и разливают в пробирки по 5–6 мл. Стерилизуют осторожно в прогревом автоклаве при температуре 112°C (не выше) в течение 30 мин. Лучше стерилизовать текучим паром 20 мин 3 дня подряд. После стерилизации среду скашивают так, чтобы оставался столбик высотой 3–4 см. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет.

**Среда обогащения ЕЕ** (в модификации Г. П. Калины) предназначена для **накопления** сальмонелл. Входящие в состав среды желчные соли и краситель подавляют развитие сопутствующей микрофлоры.

**Среда Кауфмана** — это среда **обогащения**, предназначена для культивирования сальмонелл, в ее состав включают раствор Люголя, тиосульфат натрия, раствор бриллиантового зеленого, бычьей желчи, подавляющих рост сопутствующей микрофлоры.

### Среды для индикации золотистого стафилококка

**Желточно-солевой агар** применяют для выделения стафилококков из загрязненного посторонней микрофлорой материала. К МПА добавляют 10% хлорида натрия, а перед применением в расплавленный и охлажденный до 50°C агар добавляют 20% стерильной желточной взвеси. Патогенные стафилококки на этой среде вокруг колоний образуют радужный венчик, такое явление называют лецитоветилазной реакцией.

**Солевой бульон.** В 1000 мл рыбо- или мясопептонного бульона (МПБ) растворяют 65 г хлористого натрия, фильтруют, устанавливают рН 7–7,2, стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 мин. Количество хлористого натрия можно увеличить до 90 г.

**Молочно-солевой агар.** К 1000 мл расплавленного и охлажденного до 45–60°C РПА или МПА, содержащего 65 г хлорида натрия (рН 7,2–7,4), добавляют асептически 100 мл стерильного обезжиренного молока. Среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Молочно-солевой агар применяют для выделения стафилококков из исследуемого материала (гноя, молока), в котором предполагается содержание посторонней микрофлоры. Учитывая, что стафилококки относятся к галофилам, содержание хлорида натрия в такой среде доводят до 7,5%.

**Агар типа Байрд — Паркер.** В 1000 мл дистиллированной воды размешивают 30 г сухого питательного агара на основе ферментативного гидролизата кормовых дрожжей, добавляют 10 г пирувата натрия, 5 г хлористого лития. Нагревают при помешивании и кипятят в течение 1 мин до полного растворения ингредиентов. Устанавливают рН 7,2, стерилизуют при 121°C в течение 15 мин.

Перед применением в растопленную и охлажденную до 45–60°C среду асептически добавляют (из расчета на 100 мл среды) 0,5 мл 2%-ного раствора теллурита калия и 5 мл эмульсии яичного желтка.

### **Среды для определения сульфитредуцирующих кластридий**

**Среда Вильсон — Блера.** К 100 мл стерильного расплавленного и охлажденного до 80°C РПА или МПА, содержащего 1% глюкозы, добавляют 10 мл 20%-ного раствора сульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) и 1 мл 5%-ного раствора железоаммонийных квасцов ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) [можно заменить 1 мл 8%-ного раствора железа сернистоислого ( $\text{FeSJ}_4$ ), рН среды 7,5–7,8].

Растворы солей готовят непосредственно перед применением и стерилизуют текучим паром в течение 1 ч.

**Сульфит-полимиксин-неомициновая среда (СПН).** В 1000 мл печеночного бульона асептически вносят 5 мл 10%-ного водного раствора сульфита железа закисного ( $\text{FeSO}_4$ ), 10 мл 10%-ного водного раствора сульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), полимиксина М — 200 000 ЕД, сульфата неомицина В — 50 мг. Разливают в стерильные пробирки по 9 мл.

**Печеночный бульон.** 500 г мелко нарезанной говяжьей печени кипятят в 1000 мл дистиллированной воды в течение 1 ч. Устанавливают рН 7 и вновь кипятят в течение 10 мин. Затем процеживают через ткань, доводят объем до 1000 мл и добавляют 10 г пептона и 5 г хлорида натрия. Разливают во флаконы и стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 мин.

**Среда Китта — Тароцци.** В пробирки с 2–3 кусочками вареной рыбы, вареного мяса или вареной печени наливают высоким столбиком рыбо-, мясопептонный или печеночный бульон с 1% глюкозы. На поверхность среды в пробирки наслаивают 1 мл вазелинового масла. Можно готовить агаризованную среду, добавив 0,15% агара. Стерилизуют при температуре 121°C в течение 20 мин, рН 7,2 (надо проверить до и после стерилизации).

При приготовлении среды Китта — Тароцци без добавления вазелинового масла или агара после посева на поверхность среды наслаивают голодный агар.

**Голодный агар.** 2 г агара расплавляют при нагревании в 98 мл дистиллированной воды. Стерилизуют при 121°C в течение 20 мин.

## 4.2. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ПОСУДЫ

Стерилизацией называют **полное уничтожение** всех видов и форм микроорганизмов (вегетативных и спорных) в стерилизуемых объектах.

Главными требованиями ко всем методам стерилизации являются их надежность и сохранение первоначальных свойств стерилизуемых объектов. В связи с большим разнообразием качества стерилизуемых объектов разработаны различные методы стерилизации. При выборе метода стерилизации необходимо учитывать качество стерилизуемого объекта, возможные изменения его свойств под влиянием силы излучения, высокой температуры, химических реагентов и т. д.

Различают *физический*, *химический* и *механический* методы стерилизации. К физическим методам стерилизации относят действие высокой температуры, ультрафиолетовых лучей (УФ), ионизирующей радиации, ультразвука. Химические методы применяют для обработки вакцин, сывороток и других объектов, консервируемых различными антисептиками. Механический метод рекомендуют для фильтрации жидкостей, которые нельзя нагревать. Для этого применяют специальные бактериальные фильтры, в порах которых остаются бактерии, но вирусы проходят.

### 4.2.1. Физические методы стерилизации

#### Термическая обработка

1. **Стерилизацию в пламени** (в условиях лаборатории чаще в пламени спиртовки) или фламбирование применяют только для обработки мелких инструментов, таких как бактериологические петли, пинцеты, скальпели, ножницы, пастеровские пипетки.

2. **Стерилизацию сухим жаром** проводят в электрических сушильных шкафах при 165–170°C в течение 1,5–2 ч. Этим методом стерилизуют лабораторную стеклянную посуду, предварительно завернутую в бумагу.

3. **Кипячение** в специальных стерилизаторах в течение 30–40 мин применяют для обработки хирургических инструментов, при этом вода должна быть обязательно дистиллированная, для усиления эффекта добавляют 1–2% соды. В последние годы появились разнообразные одноразовые инструменты, но, тем не менее, стерилизация методом кипячения находит применение. Недостатком этого метода является то, что есть споры, выдерживающие такой режим обработки.

4. **Стерилизация паром.** Различают обработку паром под давлением в герметично закрывающихся автоклавах и текучим паром в аппарате Коха.

*Стерилизация паром под давлением* проводится в автоклаве, который представляет собой двустенный металлический котел с герметично завинчивающейся крышкой. Между стенками всегда должна находиться вода, во время кипения которой образуется пар, поступающий в рабочую камеру. Давление внутри автоклава показывает манометр. На шкале манометра обозначается только избыточное давление, нормальное давление соответствует показанию «0». Работа с автоклавом требует строгого выполнения правил и техники безопасности, предусмотренных специальной инструкцией:

- через воронку налить дистиллированную воду до метки и закрыть кран;
- загрузить стерилизационную камеру и герметично закрыть;
- включить нагревательную систему автоклава при открытом паровыпускающем кране, дождаться появления непрерывной сухой струи пара, свидетельствующей о том, что весь воздух из рабочей камеры вытеснен, и только после этого перекрыть паровыводящий кран. Далее нагревание продолжается, образующийся пар не находит выхода, поэтому давление возрастает — мы наблюдаем это по показателю манометра.

Во время работы автоклава наблюдают за показателями двух манометров: один из них показывает давление в рабочей камере, другой автоматически поддерживает заданный режим работы.

При давлении в 0,5 атм температура в автоклаве равна 110–112°C, в 1 атм — 120–121°C, в 1,5 атм — 124–126°C, в 2 атм — 132–134°C. Длительность работы с момента достижения заданного режима продолжается 20–30 мин.

Электронагревательные приборы выключают после окончания стерилизации. Крышку автоклава открывают, соблюдая технику безопасности, только после того, как давление упадет до нуля.

При автоклавировании на бактерии губительно действуют одновременно **высокая температура** и **давление**, поэтому автоклавирование является **самым надежным** методом стерилизации. Эффективность стерилизации можно проверить, помещая в автоклав реактивы с известной точной точкой плавления или пробирки, содержащие термофильные спорообразующие бактерии, которые проверяют посевом в стерильные питательные среды. После выдерживания в термостате среды должны остаться стерильными.

В автоклаве стерилизуют питательные среды, физраствор, посуду, отработанные бактериальные культуры, халаты, вату, бинты.

*Дробная стерилизация текучим паром* проводится в аппарате Коха или в автоклаве с открытым паровыводящим краном (т. е. появляющийся пар не накапливается, а удаляется через открытые краны постоянно, поэтому температура выше 100°C не поднимается). Этот метод стерилизации рекомендуют применять для питательных сред (с углеводами, желатиной), которые изменяют свои свойства при нагревании выше 100°C. Режим работы: три дня подряд по 40 мин с момента достижения 100°C. Суть сводится к тому, что при первом прогревании вегетативные клетки погибают, а споры остаются (предполагается, что они в течение суток прорастут). Повторное прогревание на второй день вновь убивает проросшие вегетативные клетки. Третье прогревание проводят для большей надежности, при этом погибают все вновь появившиеся вегетативные клетки.

5. Пастеризация (частичная стерилизация) — прогревание при температуре ниже 100°C. Например, молоко пастеризуют при 74–76°C в течение 20 с. Цель пастеризации — уничтожение патогенных бактерий (возбудителей туберкулеза, бруцеллеза, ящура), а также гнилостных и молочнокислых бактерий. После пастеризации молоко сразу охлаждают до 4°C, чтобы предотвратить размножение оставшейся термофильной и споровой микрофлоры. Пастеризовать рекомендуют соки, пиво, вино, которые нельзя прогревать при более высокой температуре, так как происходит снижение биологической ценности пастеризуемого продукта.

### **Облучение электромагнитными волнами**

1. Ультрафиолетовые лучи (длиной 250–270 нм), подавляющие репликацию ДНК, широко применяются для санации воздуха в животноводческих помещениях, в цехах молочных заводов, в микробиологических боксах для создания асептических условий. Для дезинфекции воздуха применяют лампы низкого давления типа БУВ-15, БУВ-60.

2. Ионизирующая радиация (холодная стерилизация) поражает генетический аппарат микробной клетки. Гамма- и рентгеновское облучение применяют для уничтожения микроорганизмов на пластмассовых изделиях одноразового применения, перевязочных материалах, биопрепаратах (при этом не снижается их качество).

3. Действие ультразвука заключается в дезинтеграции цитоплазматических структур микроорганизмов. Применяют для стерилизации пищевых продуктов (молока, воды).

#### 4.2.2. Химические методы

Химические вещества могут тормозить или полностью подавлять рост микроорганизмов, поэтому их можно применять с целью профилактики микробного загрязнения питательных сред, вакцин, диагностических и лечебных сывороток.

Вакцины и лечебные сыворотки консервируют карболовой кислотой (0,5%), формалином (0,5%), мертиолятом (1:5000).

Диагностические агглютинирующие сыворотки консервируют хлороформом (который при применении улетучивается), борной кислотой, глицерином.

Мелкую стеклянную посуду, пипетки, предметные стекла дезинфицируют, погружая в 10%-ный раствор  $H_2O_2$ , 70°-ный этиловый спирт, 5%-ный раствор карболовой кислоты или щелочи.

Для дезинфекции в лабораторной практике применяют 3–5%-ные растворы карболовой кислоты, хлорамина.

#### 4.2.3. Механические методы

Эти методы основаны на **фильтрации жидкостей** через специальные бактериальные фильтры, которые задерживают видимые под микроскопом микроорганизмы. Через них свободно проходят вирусы и микоплазмы, поэтому данные методы следует признать лишь как «ча-

стичную» стерилизацию.

Механические методы стерилизации рекомендуются применять для биологических жидкостей, которые нельзя прогревать, например сыворотку крови, растворы витаминов.

Бактериальные фильтры имеют различную форму, изготавливаются из различных материалов. Они отличаются по величине пор, диаметр которых указан в прилагаемой инструкции.

В микробиологической практике широко используются *фильтры-свечи*, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка (свечи Шамберлана), из инфузорной земли (свечи Беркефельда) с различным диаметром пор, в которых фильтрация происходит только под давлением.

Особенно широкое применение нашли так называемые *мембранные фильтры-диски* различного диаметра, толщиной 0,1 мм, изготовленные из асбеста, коллодия, нитроцеллюлозы (они рассчитаны на одноразовое применение). Фильтры монтируют в прибор Зейтца, который состоит из приемного стакана-воронки и колбы Бунзена. Перед работой собранный прибор заворачивают в бумагу и стерилизуют автоклавированием. Жидкость, подлежащую стерилизации, наливают в воронку прибора, внутри колбы создают вакуум и жидкость проходит через фильтры, освобождаясь от бактерий.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Ознакомиться с компонентами питательных сред, с рецептурой приготовления МПБ, МПА. Подготовить и взвесить по рецепту сухой агар-агар, пептон, поваренную соль, отмерить мясной экстракт мерными мензурками, соединить все компоненты в колбе и поставить для кипения на электроплитку.

2. Разлить приготовленный МПА в пробирки по 5 и 13 мл, закрыть пробками и подготовить для автоклави-

рования. Одну пробирку для проверки качества агара скосить, охладить и убедиться в плотности среды.

3. Ознакомиться с фабричными питательными средами, приготовить из них агар Эндо, агар Левина по методике, указанной на этикетке.

4. Ознакомиться с оборудованием кафедры (горизонтальными и вертикальными автоклавами, электрическим сушильным шкафом, аппаратом Коха), правилами работы, техникой безопасности при работе с этими приборами.

5. Провести демонстрацию фильтрации воды через фильтр из нитроцеллюлозы, применив аппарат Зейтца, смонтированный в колбу Бунзена.

6. Провести кипячение с целью стерилизации МПА и МПБ в пробирках, пробирки поставить в термостат на 24 ч, на следующем занятии проверить результаты и убедиться, что спорообразующие остались и проросли (в МПА и МПБ появились признаки роста).

7. Приготовить 3% -ный раствор карболовой кислоты и 3% -ный раствор хлорамина.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой целью применяется стерилизация?
2. Что учитывают при выборе метода стерилизации?
3. На чем основаны физические методы стерилизации?
4. На чем основаны механические методы стерилизации и для каких сред они рекомендуются?
5. Назовите недостатки таких методов стерилизации, как кипячение и пастеризация.
6. Как готовят мясную воду?
7. Какие среды относятся к обычным и их назначение?
8. Какие среды относятся к дифференциально-диагностическим и их назначение?
9. Какие компоненты придают селективность питательной среде?
10. С какой целью добавляют ингибиторы в питательные среды?

## **МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Цель занятия.** Овладеть техникой посева бактерий на питательные среды. Ознакомиться с методами культивирования аэробных микроорганизмов. Освоить методы выделения чистой культуры.

**Материалы и оборудование.** Пробирки со смесью золотистого стафилококка и кишечной палочки. Чашки Петри с МПА для выделения чистой культуры методом Дригальского, чашки Петри с агаром Эндо для выделения чистой культуры кишечной палочки, бактериологические петли, спиртовки. Набор красок для окраски по Граму, предметные стекла, иммерсионное масло, микроскопы.

### **5.1. ТЕХНИКА ПОСЕВА БАКТЕРИЙ НА ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ**

Все микробиологические исследования проводят в специальных помещениях — боксах. Посевы и пересевы проводят над пламенем спиртовки, инструментами для посева служат бактериологические петли, иглы и пастеровские пипетки.

При посеве бактерий на питательные среды или пересеве из одной пробирки в другую применяют следующую методику. Пробирку с чистой культурой и пробирку со скошенным МПА берут в левую руку так, чтобы пробирка с чистой культурой была первой по отношению к работающему. В правой руке находятся бактериологическая петля и две пробки от открытых пробирок, зажатые мизинцем и безымянным пальцем. Обжигают края открытых пробирок и вводят прокаленную петлю в пробирку с культурой. Петлю охлаждают о внутреннюю стенку пробирки или прикасаются к участку незасеянного агара и, если он не плавится, захватывают петлей часть бактериальной культуры. Быстро и осторожно вносят петлю с культурой в пробирку со стерильной средой, опускают до дна косяка и зигзагообразным движением петли распределяют материал по скошенной поверхности агара. После посева петлю извлекают, обжигают края пробирок и закрывают пробирки обожженными пробками, затем прокаливают петлю.

Для посева в жидкие питательные среды применяют методику, описанную выше, только петлю с бактериальной культурой вносят в МПБ.

Посев на плотные среды в чашках Петри проводят также бактериологической петлей или стеклянным шпателем. Для этого крышку чашки Петри чуть приподнимают левой рукой, вводят под крышку бактериологическую петлю с посевным материалом и распределяют посевной материал по поверхности среды различными методами в зависимости от конечной цели: штрихом для получения изолированных колоний или сплошной посев «газоном».

В пробирки с посевами, закрытых ватными пробками, и в чашках Петри, прикрытых крышками, воздух проникает во внутрь, что позволяет аэробным бактериям хорошо развиваться.

## 5.2. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Для выращивания микроорганизмов в лабораторных условиях применяют термостат, в котором круглосуточно автоматически поддерживается постоянная температура.

Термостат представляет собой двустенный шкаф с сетчатыми полками внутри и открывающейся дверью, сделанными из теплоизолирующих материалов. Между двумя стенками находится дистиллированная вода или воздух, если термостат суховоздушный. Источником нагрева в термостате являются электронагревательные элементы, которые прогревают воду или воздух. Температура автоматически поддерживается на заданном уровне, для большинства сапрофитных и патогенных микроорганизмов в пределах 37°C, так как эта температура для них является оптимальной. При выращивании МАФАНМ (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов), для которых оптимальной является температура 30°C, применяют другой суховоздушный термостат. Таким образом, в микробиологической лаборатории должны быть два термостата: с температурой 37 и 30°C. В термостат помещают штативы с пробирками, колбы и чашки Петри с посевами изучаемых микроорганизмов.

Для успешного культивирования бактерий необходимо применять свежие питательные среды. Особенно это касается плотных питательных сред, которые разливают в чашки Петри или скашивают в пробирках обязательно в день посева, чтобы были видны капельки свежего конденсата. При выращивании аэробов и факультативных анаэробов аэрация происходит в **естественных условиях** без применения каких-либо дополнительных приборов.

Сроки культивирования большинства патогенных, условно патогенных микроорганизмов составляют 24–48 ч, только некоторые растут медленно, например возбудитель туберкулеза 10–14 дней.

Для полного понимания темы необходимо знать специальные термины, применяемые в микробиологической практике.

*Посев* — первичное внесение исследуемого материала в питательные среды. Цель посева — выделение и накопление возбудителя для дальнейшего изучения. *Пересев* — перенос выросшей бактериальной культуры в новую питательную среду. *Бактериальной культурой* называют микроорганизмы, выросшие на искусственных питательных средах. Различают *чистую* бактериальную культуру, в которой все бактерии относятся к одному виду, и *загрязненную*, если в ней присутствуют неизвестные бактерии. Любое бактериологическое исследование начинают с выделения **чистой** культуры, так как только в чистой культуре можно определить вид возбудителя.

Перед началом работы пробирки с 5 мл МПА расплавляют в кипящей водяной бане, пробирку с горячим жидким агаром фиксируют в наклонном положении, чтобы получить скошенную поверхность, удобную для посева. Для этого конец пробирки с пробкой приподнимают и кладут на пластинку высотой 1–1,5 см, в результате на дне пробирки должен получиться столбик высотой 3 см, переходящий в косяк. Пробирку с 15 мл МПА также расплавляют и выливают в стерильную чашку Петри, крышку чашки закрывают, чашку ставят на ровную поверхность, после охлаждения получается плотная пластинка среды, готовая для посева.

При посеве необходимо соблюдать следующие правила: работа должна проводиться в боксе, над пламенем спиртовки, петлей нельзя прикасаться к посторонним предметам, ватные пробки на стол не класть. Начинаящим бактериологам нужно предварительно приобрести навыки работы в боксе: имитируя посева над пламенем

спиртовки, открывая и закрывая пробирки, научиться одновременно держать в правой руке бактериологическую петлю и три пробки, имитируя посевы с пустыми пробирками и чашками.

### **5.3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ**

Обычно исследуемый материал, содержащий возбудителя пищевых токсикоинфекций, возбудителя инфекционной болезни, загрязнен сопутствующей микрофлорой — выделить чистую культуру из исследуемого материала является основной задачей при проведении бактериологического исследования.

Морфологические, культуральные и ферментативные особенности микроорганизмов, необходимые для определения вида микроорганизма, изучают, применяя только чистые культуры бактерий.

В лабораторной практике применяются следующие методы выделения чистой культуры.

#### **5.3.1. Механические методы**

Они основаны на механическом разъединении бактерий друг от друга. В истории микробиологии известны метод Пастера, Коха, но в лабораторной практике чаще применяют метод Дригальского. Суть этого метода заключается в том, что бактериологической петлей каплю исследуемого материала (кровь, молоко, мясо) наносят на поверхность плотной среды в чашке Петри и распределяют по поверхности так, чтобы механически разъединить бактерии, каждая из которых должна образовать изолированную колонию. Бактерии, оставшиеся на поверхности питательной среды, размножаются поперечным делением со скоростью

20–30 мин, поэтому за сутки образуют видимую колонию. При этом надо учитывать, что **одна** бактерия образует **одну** колонию, поэтому все бактерии в этой колонии будут принадлежать к одному виду. После посева чашку маркируют, ставят в термостат при 37°C на 24 ч. Появившиеся колонии изучают с помощью лупы, нужную колонию обводят восковым карандашом со стороны дна чашки, готовят из нее мазок и окрашивают по Граму. При микроскопии изучают морфологические особенности (форма, наличие споры и капсулы) и отношение бактерий к окраске по Граму. Далее, чтобы получить чистую культуру, из нужной колонии бактериологической петлей делают пересев на МПА и МПБ в пробирках. На следующий день из выросшей культуры делают препарат для микроскопии и, убедившись в том, что выделенная бактериальная культура морфологически однородная, приступают к изучению ее культуральных, ферментативных свойств и подвижности для определения вида.

### 5.3.2. Биологические методы

Они основаны на учете биологических особенностей бактерий, таких как устойчивость к высокой температуре и кислоте, подвижность, а также их патогенность.

1. *Применение высокой температуры.* Для выделения чистой культуры *спорообразующих* микроорганизмов исследуемый материал прогревают 10–20 мин при 80°C в расчете на то, что менее стойкие вегетативные формы погибнут при этой температуре, а споры останутся жизнеспособными. Из прогретого материала делают первичный посев в питательные среды, на которых вырастают изолированные колонии спорообразующих микроорганизмов. Из этих колоний делают пересев в

пробирки с МПА и МПБ и получают чистую культуру нужного возбудителя.

2. Для выделения чистой культуры *кислотоустойчивых* возбудителей туберкулеза патологический материал обрабатывают 5–10%-ным раствором серной кислоты в течение 10–15 мин. Благодаря действию кислоты погибает сопутствующая микрофлора, а возбудитель туберкулеза остается жизнеспособным. После нейтрализации раствора кислоты 1%-ным раствором гидроксида натрия исследуемый материал вносят на специальные питательные среды, на которых растут возбудители туберкулеза.

3. Для выделения чистой культуры *патогенных микроорганизмов*, находящихся в загрязненном исследуемом материале, проводят заражение молодых восприимчивых лабораторных животных (кролики, морские свинки, белые мыши). Организм животного здесь играет роль биологического фильтра, через который проходят патогенные микроорганизмы, вызывающие гибель животного. После заражения и гибели животных трупы вскрывают и из **всех** внутренних органов делают препараты на предметном стекле, а также посевы на питательные среды. Полученную чистую культуру изучают, определяют вид возбудителя.

4. Выделение подвижных микроорганизмов (метод Щукевича). С поверхности исследуемого материала (мясо, колбаса) бактериологической петлей делается соскоб, который вносят в конденсат скошенного МПА, пробирку ставят в термостат при 37°C на 24 ч. Если в исследуемом материале были подвижные палочки протей, они дают характерный ползучий рост вверх по скошенному агару, из появившихся колоний делают посев на питательные среды, получают чистую культуру и определяют ее вид. Наличие палочки протей в исследуемом материале свидетельствует об антисанитарных условиях хранения продуктов питания.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Приготовить препараты из смеси двух бактериальных культур — кишечной палочки и стафилококка, окрасить по Граму, провести микроскопию и убедиться в наличии смешанной культуры.

2. Провести имитацию посева бактериологической петлей в пустые пробирки над пламенем спиртовки, научиться держать три пробирки в левой руке, бактериологическую петлю и пробки в правой руке. Научиться открывать и закрывать пробки над пламенем спиртовки.

3. Провести посев бактериологической петлей смеси двух культур методом Дригальского на поверхность МПА в чашках Петри для получения изолированных колоний и выделения чистой культуры золотистого стафилококка, образующего колонии золотистого цвета.

4. Провести посев смеси двух культур на агар Эндо для выделения чистой культуры кишечной палочки, которая образует красные колонии с металлическим блеском.

5. Овладеть методикой посева исследуемого материала в конденсационную воду скошенного МПА с целью получения чистой культуры вульгарного протeya.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. С какой целью выделяют чистую культуру микроорганизмов?

2. Перечислите методы выделения чистых культур бактерий.

3. На чем основаны механические методы выделения чистых культур?

4. На чем основаны биологические методы выделения чистых культур?

## **МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Цель занятия.** Ознакомиться с питательными средами и методами создания анаэробных условий для культивирования анаэробных микроорганизмов.

**Материалы и оборудование.** Анаэростат, масляный вакуумный насос, эксикатор с притирающейся крышкой. Набор стерильных питательных сред для культивирования анаэробов и демонстрационных посевов анаэробов на следующих питательных средах — МППБ, мозговая среда и молоко высоким столбиком в пробирках со слоем вазелинового масла, сахарный агар в трубках, кровяной агар в чашках Петри, среда Вильсон — Блера.

Для культивирования анаэробных микроорганизмов необходимо, чтобы питательная среда и окружающее пространство были без кислорода. Для выделения чистых культур анаэробов применяют особые методы, обеспечивающие снижение парциального давления кислорода в питательной среде или окружающем пространстве.

## 6.1. МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ АНАЭРОБИОЗА

1. **Физические методы** основаны на том, что из замкнутого пространства, в которое поместили посевы с анаэробами, выкачивают воздух при помощи масляного вакуумного насоса. Обычно в лабораторной практике применяют анаэростат или эксикатор с краном, через который при помощи вакуумного масляного насоса удаляют воздух. При помощи этих насосов можно достигнуть вакуума до 3–4 мм рт. ст. и даже до 0,05 мм. Степень разрежения воздуха в анаэростате показывает ртутный манометр, укрепленный на крышке прибора. После выкачивания воздуха кран закрывают и прибор ставят в термостат.

2. **Химические методы** создания анаэробии основаны на том, что кислород, находящийся в эксикаторе или анаэростате, связывают химическими препаратами. Например, на дно эксикатора или анаэростата помещают порошок пирогаллола и 10%-ный раствор едкого натра (калия), при взаимодействии которых связывается весь кислород из замкнутого пространства. Либо в эксикатор ставят открытую чашку с увлажненной смесью гидросульфита натрия с гидрокарбонатом натрия в соотношении 1:1, в результате взаимодействия между этими реагентами происходит связывание кислорода воздуха.

3. **Биологический метод** создания анаэробии основан на совместном выращивании аэробов и анаэробов, при этом рассчитывают на то, что вначале растет аэробная культура, а затем, после поглощения ею кислорода, начинают развиваться анаэробы.

Например, в центре чашки Петри с сахарным, кровавым агаром вырезают и удаляют полоску среды шириной 1–1,5 см, разделяя этим среду на две половинки. Затем на одну половину чашки делают посев аэробов (*Serratia marcescens*, *Bac. subtilis*), а на другую половину делают посев изучаемых анаэробов, края чашки герметизируют лейкопластырем. Этот метод можно применять только для нестрогих анаэробных бактерий.

**4. Комбинированный метод** заключается в том, что для большей надежности созданного анаэробноза применяют одновременно два метода. Например, вначале выкачивают воздух при помощи насоса, а остаток кислорода связывают химическим методом или наличием в замкнутом пространстве посевов аэробных бактерий.

При культивировании анаэробов следует придерживаться следующих правил:

1) для выращивания анаэробов применяют только органические специальные питательные среды, в состав которых входят глюкоза и кусочки печени или мышц, играющие роль восстанавливающего фактора;

2) все жидкие питательные среды разливают высоким столбиком, для изоляции от кислорода воздуха на их поверхность наслаивают 2 мл вазелинового масла;

3) жидкие питательные среды перед посевом следует регенерировать в кипящей водяной бане в течение 20 мин для удаления воздуха;

4) исследуемый материал перед посевом следует прогревать в водяной бане в течение 20 мин при 80°C для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры.

Особенностью посева анаэробных микроорганизмов является то, что исследуемый материал в питательные среды вносят в больших дозах, поэтому инструментом для посева анаэробов служат не петли, а пастеровские пипетки. Подготовленный исследуемый материал набирают пастеровской пипеткой, верхний конец которой плотно закрывают пальцем, а кончик пипетки вводят через масло в МППБ, являющийся накопительной средой.

Питательные среды, применяемые для культивирования анаэробов, делят на:

1) *накопительные* — для первичного посева;

2) *дифференциальные* — позволяющие дифференцировать один вид от другого.

**Накопительные среды.** К накопительным средам относятся *мясопептонный печеночный бульон (МППБ)* или *среда Китта — Тароцци* — основная питательная среда для первичного выделения и последующего культивирования анаэробов. В ее состав входят печеночный

бульон и МПБ в соотношении 1:2, поваренная соль, рН 7,6. Среду разливают по пробиркам высоким столбиком, добавляют кубики печени (обладающей восстанавливающими свойствами), наслаивают 2 мл вазелинового масла для изоляции от воздуха. Автоклавируют при 120°C в течение 30 мин. После длительного хранения МППБ перед посевом пробирки с МППБ регенерируют 20 мин кипячением в водяной бане и охлаждают перед посевом. В результате размножения анаэробов на этой среде в первые сутки появляется помутнение, у некоторых газообразование, а иногда и специфический запах.

**Дифференциальные среды.** На дифференциальных средах анаэробы образуют колонии, характерные для каждого вида, что позволяет дифференцировать их друг от друга по культуральным признакам, а на некоторых дифференциальных средах одновременно изучают и ферментативные свойства. Методические приемы позволяют выращивать строгие анаэробы без использования анаэростана и эксикатора. К дифференциальным средам относятся следующие питательные среды.

*Сахарный агар* — к обычному МПА добавляют 1% глюкозы. Сахарный агар перед использованием расплавляют, охлаждают до 50°C и добавляют нативный или разведенный 1:10 исследуемый материал, тщательно перемешивают, всасывают в стерильные узкие трубки — трубки Вейона длиной до 20–25 см, диаметром около 1 см. Один конец трубки запаивают, другой закрывают ватой и помещают в термостат на сутки. На этой среде изучают газообразование (разрыв агара) и форму изолированных глубинных колоний, которые хорошо просматриваются визуально или при помощи лупы в глубине агара. Для некоторых анаэробов характерно образование колоний в виде диска или двояковыпуклой линзы, колоний с тонкими отростками, в виде комочка ваты и т. д.

*Глюкозо-кровяной агар* — к расплавленному и охлажденному до 50°C обычному агару добавляют 1–2% глюкозы, 15% дефибринированной крови барана, размешивают и разливают по чашкам Петри. На поверхность застывшего кровяного агара делают посев изучаемых

анаэробов. На этой среде можно одновременно изучить форму колоний на поверхности питательной среды и гемолитические свойства выделенного возбудителя. Чашки Петри с посевами анаэробов при культивировании обязательно ставят в анаэростат.

*Среда Вильсон — Блера, или железосульфитный агар (ЖСА),* — к 100 мл расплавленного МПА добавляют 1–2% глюкозы, 10 мл 20% -ного раствора сульфита натрия и 1 мл 8% -ного раствора хлорида железа. Устанавливают рН на уровне 7,8. В стерильную пробирку вносят расплавленный ЖСА и исследуемый продукт (материал), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри по методу Перетца. Анаэробные бактерии восстанавливают сульфит натрия до сульфата натрия, который, вступая в реакцию с хлоридом железа, образует черный осадок сульфита железа, окрашивающего колонии в черный цвет.

Метод посева анаэробов в модификации Перетца заключается в том, что на дно чашки Петри параллельно укладывают две спички без серной головки, на которые кладут стеклянную пластинку размером 5,5×5,5 см. В подготовленную чашку наливают исследуемый материал, распределенный в ЖСА, который затекает в образовавшийся зазор под стекло, где создаются строгие анаэробные условия, после застывания среды по верх стекла наливают тонкий слой голодного агара для полной изоляции от кислорода. Если в исследуемом материале были анаэробные бактерии, то во время культивирования в термостате они образуют колонии, окрашенные в черный цвет. В зависимости от количества анаэробных бактерий в исследуемом материале почернение среды может быть сплошным или в виде изолированных колоний. Большинство анаэробов образуют колонии в течение 20–24 ч, для *Cl. perfringens* характерно появление черных колоний уже через 6–8 ч после посева.

*Мозговая среда* — готовится из свежего мозга крупного рогатого скота, который пропускают через мясорубку, заливают водой в соотношении: 2 части мозгового фарша

и 1 часть воды, добавляют сульфит натрия с хлоридом железа, как в ЖСА. Смесь раскладывают высоким столбиком в пробирки, поверхность заливают 2 мл вазелинового масла, автоклавируют при 110°C в течение 2 ч. Дифференциальным признаком при росте анаэробов на этой среде является ее почернение в результате образования сероводорода, который вступает в реакцию с хлоридом железа (образуется сернистое железо).

*Молоко* — к обезжиренному молоку добавляют кусочки печени, сыворотку крови, разливают высоким столбиком, наслаивают вазелиновое масло и дробно стерилизуют. Дифференциальным признаком является скорость свертывания молока, характер створаживания и пептонизация его.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Ознакомиться с правилами работы с масляным вакуумным насосом при создании вакуума в анаэроостате, а также методом создания анаэробных условий в эксикаторе.

2. Ознакомиться с набором питательных сред для культивирования анаэробов.

3. Ознакомиться с методами культивирования анаэробов в эксикаторе и анаэроостате.

4. Ознакомиться с культуральными свойствами анаэробов на питательных средах после посева анаэробов. Изучить признаки роста анаэробов, являющихся дифференциальными для анаэробных микроорганизмов.

5. Ознакомиться с особенностями техники посева анаэробных микроорганизмов в специальные питательные среды.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Перечислить методы создания анаэробноза и дать краткую характеристику каждому методу.
2. Перечислить требования, предъявляемые к питательным средам для культивирования анаэробов.
3. Методические особенности посева анаэробных микроорганизмов.

## КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

**Цель занятия.** Ознакомить студентов с методами изучения культуральных свойств бактерий на плотных и жидких питательных средах.

**Материалы и оборудование.** Набор демонстрационных посевов на МПА и МПБ с различными культуральными признаками. Чашки Петри с посевами, проведенными на предыдущем занятии. Пробирки со стерильным скошенным МПА и МПБ для отсева изолированных колоний золотистого стафилококка и кишечной палочки из чашек Петри. Набор демонстрационных посевов на МПА и МПБ с различными культуральными признаками. Бактериологические петли, спиртовки. Набор красок для окраски по Граму, предметные стекла, иммерсионное масло, микроскопы.

**Таблицы.** Культуральные свойства бактерий на плотных питательных средах.

*Культуральные свойства* — это характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах, изучают для определения вида микроорганизмов. Культуральные свойства бактерий в некоторой степени зависят и от подвижности. Так, вульгарный протей образует ползущие по всей поверхности колонии, а его неподвижный вариант — небольшие четко оформленные колонии.

## 7.1. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ НА ПЛОТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

В благоприятных условиях в результате размножения одной микробной клетки на поверхности питательной среды образуются скопления микробной массы — колонии. Разные микроорганизмы в зависимости от вида образуют различные колонии. Чаще культуральные свойства изучают у суточной культуры, но некоторые виды образуют видимые колонии через 10–14 дней. Колонии изучают визуально или при помощи лупы в проходящем свете, при этом учитывают следующие культуральные признаки:

- величину колоний (различают мелкие, росинчатые — 1 мм и крупные — 5 мм в диаметре, при этом быстро растущие колонии образуют крупные колонии, а медленно — мелкие);
- край колоний (гладкий, изрезанный, зубчатый, в виде лопастей и т. д.);
- форма колоний (круглые, правильной формы в научной литературе их называют «S-формы»; колонии неправильной формы — «R-формы»);
- степень прозрачности (прозрачные, плотные, вросшие в агар);
- наличие пигмента проявляется особенно интенсивно при солнечном свете (белые, желтые, красные, прозрачные);
- консистенция колоний определяется прикосновением бактериологической петли (может быть слизистая, тягучая; сухая характерна для бактерий, образующих споры);
- поверхность (плоская, выпуклая, морщинистая, кратерная).

Колонии некоторых видов микроорганизмов издают характерный специфический запах (например, вульгарный протей), колонии других видов вырастают в толщу питательной среды и иногда окрашивают его.

## 7.2. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ В ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Стерильный МПБ прозрачный, а после посева и размножения микроорганизмов бульон изменяется и появляются следующие признаки:

- помутнение (обильное, умеренное или в виде нежной опалесценции);
- поверхностный рост характерен для аэробов, он может быть в виде пристеночного кольца или пленки различной толщины и консистенции, например у возбудителей туберкулеза;
- осадок на дне пробирки изучают при легком встряхивании в проходящем свете, он может быть хлопьевидный, крошковидный или слизистый, который при встряхивании поднимается в виде слизистой косички;
- пигмент окрашивает питательную среду в синезеленый, желтый или красный цвет, в зависимости от вида бактерий.

Культуральные свойства — это **шестой** признак, изучаемый при определении вида бактерий.

### ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Изучить культуральные свойства бактерий, выросших на МПА после посева методом Дригальского. Обратить внимание на изолированные колонии имеющие S- и R-формы.

2. Изучить культуральные свойства колоний золотистого стафилококка. Приготовить из них препараты, окрасить по Граму, определить тинкториальные свойства золотистого стафилококка.

3. Изучить культуральные свойства бактерий, выросших на агаре Эндо. Обратить внимание на красные коло-

нии с металлическим блеском. Приготовить из них препараты, окрасить по Граму, определить тинкториальные свойства кишечной палочки.

4. Сделать посев-отпечаток пальцев рук всех студентов группы на поверхности МПА в чашках Петри с целью контроля количества и качества микрофлоры кожи рук, **обратить внимание**, что все эти бактерии могут быть источником загрязнения поверхности пищевых продуктов, к которым прикасаются руки.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. С какой целью изучают культуральные свойства микроорганизмов?
2. Опишите культуральные свойства бактерий на плотных питательных средах.
3. Опишите культуральные свойства бактерий на жидких питательных средах.
4. Перечислите все признаки, по которым определяют вид бактерий.

## **ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ (БИОХИМИЧЕСКИЕ) СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ**

**Цель занятия.** Освоить методы изучения ферментативных (биохимических) свойств микроорганизмов, таких как сахаролитические, протеолитические.

**Материалы и оборудование.** Набор сред Гисса (или короткий пестрый ряд) с демонстрационными посевами бактерий кишечного-тифозного семейства; агар Эндо с посевом кишечной палочки и сальмонеллы, колонии которых в виде слов *E. coli* и *Salmonella* написаны бактериологической петлей, содержащей соответствующую культуру. Бактериологические петли, спиртовки. Набор красок для окраски по Граму, предметные стекла, иммерсионное масло, микроскопы.

**Таблицы.** Биохимическая дифференциация бактерий кишечного-тифозного семейства, среды Гисса (короткий и длинный пестрый ряд).

К настоящему моменту вы знакомы с шестью признаками бактерий, при помощи которых можно определить вид. Но мир микроорганизмов так сложен, что **разные виды** микроорганизмов обладают одинаковыми морфологическими, тинкториальными, культуральными признаками, и иногда только по набору ферментов, генетически закрепленных за каждым видом, их можно дифференцировать друг от друга.

**Ферментативные свойства** — это способность бактерий при помощи ферментов расщеплять сложные органические соединения. Каждый вид микроорганизмов синтезирует определенный набор ферментов, эта способность генетически закреплена, поэтому по наличию или отсутствию фермента можно определить вид микроорганизмов. Для изучения ферментативных свойств микроорганизмов готовят питательные среды строго определенного состава, в которые бактериологической петлей вносят изучаемые микроорганизмы в виде чистой культуры. Наличие фермента определяется:

- по изменению физического состояния питательной среды (разжижение МПЖ, наличие пузырьков газа в поплавках или в полужидкой среде, свертывание молока);
- по изменению рН в дифференциально-диагностических средах (агаре Эндо, Левина, Плоскирева, средах Гисса с различными углеводами);
- по изменению цвета индикаторных бумажек при образовании конечных газообразных продуктов (сероводород, индол, аммиак).

**Сахаролитические свойства** бактерий изучают на питательных средах, в состав которых входит какой-либо углевод и индикатор.

Для изучения сахаролитических свойств применяют **жидкие** (среды Гисса) и **плотные** питательные среды (среды Эндо, Левина, Плоскирева). Бактерии, имеющие определенные ферменты, расщепляют углеводы, высшие спирты до альдегидов, кислот и газообразных продуктов ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ).

В жидких питательных средах образование кислоты устанавливают по изменению цвета индикатора, а появление газа — по пузырькам газа в пробирках-поплавках и в глубине полужидкого агара.

При отсутствии ферментации углевода цвет среды не меняется. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только некоторые углеводы, входящие в состав сред Гисса, наблюдается довольно пестрая картина. Поэтому

набор сред с углеводами и цветным индикатором был назван пестрым рядом.

На плотных дифференциально-диагностических средах, в состав которых входят углеводы и индикатор, вырастают колонии, имеющие различную окраску. Например, кишечная палочка, ферментирующая лактозу до молочной кислоты, которая изменяет рН в кислую сторону, на агаре Эндо образует красные колонии, а сальмонеллы, не имеющие фермента лактазы, — бесцветные колонии.

Особенно важно изучение сахаролитических ферментов при дифференциации бактерий кишечного семейства, например представителей родов *Salmonella* и *Escherichia*. Бактерии этих родов не отличаются друг от друга по первым шести признакам: все палочки, граммотрицательные, спор и капсул не образуют, подвижны (за исключением *S. pullorum-gallinarum*), культуральные признаки на МПА и МПБ тоже очень сходные. И только по седьмому признаку, по набору ферментов, их можно дифференцировать друг от друга и даже определить вид (табл. 6).

Таблица 6

**Дифференциация бактерий кишечного семейства в средах Гисса (короткий пестрый ряд)**

Виды бактерий	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Маннит
<i>E. coli</i>	КГ	КГ	—	КГ
<i>S. enteritidis</i>	КГ	—	—	КГ
<i>S. typhi</i>	К	—	—	К

*Примечания.* КГ — кислота и газ; К — кислота; «—» — нет изменений.

Из таблицы 6 видно, что только у кишечной палочки имеется фермент, расщепляющий лактозу до кислоты и газа, эта особенность используется для дифференциации эшерихий от сальмонелл в среде Эндо, Левина, Плоскирева, а также при санитарно-микробиологическом исследовании пищевых продуктов — в среде Кесслера.

**Протеолитические свойства** бактерий изучают на средах, в состав которых входят белки — МПЖ, МПБ, молоко.

Под действием протеолитических ферментов молоко свертывается, а в дальнейшем в результате глубокого расщепления компонентов молока происходит пептонизация и сгусток просветляется.

Посев изучаемых бактерий делают уколом в глубину столбика МПЖ. Посевы не ставят в термостат и наблюдают за появляющимися после посева изменениями 5–7 дней при комнатной температуре, при этом изучают не только разжижение среды, но и его особенности. Под действием протеолитических ферментов разжижение может происходить на поверхности в виде воронки, если это аэробные, и в глубине — если это анаэробные бактерии.

При глубоком расщеплении белка до конечных продуктов выделяются индол, аммиак, сероводород. Для выявления этих газов над засеянной средой между стенкой пробирки и пробкой фиксируют индикаторную бумагу, посевы выдерживают в термостате в течение 1–3 сут:

- для обнаружения *индола* индикаторную полоску, пропитанную насыщенным раствором щавелевой кислоты, фиксируют над посевом в МПБ. При выделении индола на 2–3-й день после посева нижняя часть полоски бумаги приобретает розовый цвет, в результате соединения индола со щавелевой кислотой;
- для обнаружения *аммиака* над посевом в МПБ фиксируют розовую лакмусовую полоску индикаторной бумаги, которая синееет;
- для обнаружения *сероводорода* над посевом в МПБ фиксируют полоску бумаги, пропитанную уксуснокислым свинцом. При взаимодействии сероводорода и уксуснокислого свинца бумага чернеет за счет образования сернистого свинца;

- для определения фермента **каталазы**: бактериальную массу снимают с поверхности агара бактериологической петлей и суспендируют на предметном стекле в капле 3% -ного раствора перекиси водорода. Если изучаемая культура выделяет каталазу, в капле появятся пузырьки газа.

Ферментативные свойства — это **седьмой** признак, изучаемый при определении вида бактерий.

Таким образом, мы изучили семь признаков, по которым можно определить вид микроорганизмов. Методы изучения всех семи признаков очень громоздкие, длительные, а современные темпы не позволяют останавливаться на достигнутом. В настоящее время предложено много усовершенствованных методов определения вида, при изучении темы 10 «Серологические методы диагностики и инфекционных болезней» мы познакомимся с реакцией агглютинации на предметном стекле, позволяющей быстро определить вид бактерий.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Освоить методы изучения ферментативных свойств кишечной палочки и сальмонелл на демонстрационных посевах на среды Гисса (короткий пестрый ряд) и агаре Эндо. Определить вид «зашифрованного микроба», посеянного в пробирки короткого пестрого ряда по изменению цвета индикатора и наличию газа в поплавках, используя данные биохимической дифференциации.

2. На агаре Эндо провести дифференциацию колоний кишечной и сальмонеллезной палочек по цвету колоний. Очень демонстративно получается, если слова *E. coli* и *Salmonella* написать на поверхности агара.

3. Освоить методы изучения протеолитических свойств бактерий на МПЖ, на молоке.

4. Освоить методы определения сероводорода, аммиака, индола, выделяемых изучаемыми микроорганизмами.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. С какой целью изучают ферментативные свойства бактерий?

2. Какие углеводы входят в среды Гисса и до каких конечных продуктов происходит расщепление углеводов?

3. Какие ферментативные свойства изучают у бактерий?

4. С какой целью изучают ферментативные свойства бактерий?

## МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ — ПЛЕСНЕВЫЕ ГРИБЫ И ДРОЖЖИ

**Цель занятия.** Изучить морфологические и культуральные свойства микроскопических грибов различных таксономических групп.

**Материалы и оборудование.** Чашки Петри с посевами микроскопических грибов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, а также пробирка со взвесью пекарских дрожжей в физиологическом растворе. Микроскопы, микологические крючки, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, флакончик со смесью воды, спирта и глицерина в равных объемах для приготовления препарата из плесневых грибов.

Микроскопические грибы — хемоорганотрофные микроорганизмы, эукариоты, не содержащие хлорофилла. Относятся к царству *Fungi* (лат.) или *Mycota* (греч.), включающему в себя около 120 тыс. видов. Широко распространены в природе: почве, воде, растениях, продуктах питания. Дифференциация плесневых грибов и дрожжей иногда затруднена, так как есть переходные формы, различия между которыми почти неуловимы. В качестве критерия, отличающего дрожжи от плесеней, используют способность плесеней образовывать длинные, разветвленные нити-гифы:

1) гифомицеты:

- высшие, микомицеты, многоклеточные;
- низшие, фикомицеты, одноклеточные;

2) дрожжи (плесневые грибы), одноклеточные (мицелий отсутствует), иногда образуют псевдомицелий.

Вегетативное тело гриба состоит из ветвящихся нитевидных гифов, переплетение которых образует мицелий или грибницу. Различают субстратный мицелий, находящийся в глубине питательной среды, и воздушный, возвышающийся над средой, часто несущий специальные органы размножения.

У низших грибов мицелий несептирован и представлен одной разветвленной клеткой с ядрами и без перегородок.

У высших грибов в гифах имеются перегородки (септы), разделяющие их на отдельные одноядерные или многоядерные клетки.

Микроскопические грибы размножаются вегетативным и репродуктивным способами.

**Вегетативное размножение** происходит без специальных органов размножения — одноклеточными или многоклеточными обломками мицелия, образующимися при распаде мицелия. При старении культуры каждая клетка покрывается оболочкой, превращается в особую форму существования (хламидоспоры, оидии, артроспоры, бластоспоры), которая, попав в благоприятные условия, также может дать жизнь новому организму. Все перечисленные виды спор представляют собой видоизмененный мицелий, т. е. их образование относится к вегетативному способу размножения.

**Репродуктивный способ размножения при помощи спор.** При этом различают бесполое и половое размножение.

**Бесполое размножение** осуществляется посредством разнообразных органов спороношения:

- у низших грибов — на верхушке вертикальных спорангиеносцев формируется шарообразный спорангий, заполненный эндоспорами;
- у высших грибов — на специализированных ответвлениях гифов — формируются конидиеносцы, заканчивающиеся булабовидными утолщениями со стеригмами, метулами, из которых выталкиваются экзоспоры или конидии.

При половом размножении грибов спорообразованию предшествует половой процесс. Грибы, у которых обнаружен половой способ размножения, относятся к совершенным грибам, без полового процесса — к несовершенным. Способы полового размножения неодинаковы. В результате полового процесса у *Ascomycota* образуются аски — специализированные сумки, заполненные аскоспорами, а у *Basidiomycota* — на поверхности базидий — экзогенные базидиоспоры.

## 9.1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ НИЗШИХ И ВЫСШИХ ГРИБОВ

Типичный представитель фикомицетов (низших грибов) — *Mucor*, или головчатая плесень. Мицелий мукора состоит из одной разветвленной клетки, от которой вертикально отходят воздушные гифы — спорангиеносцы, заканчивающиеся черными круглыми спорангиями (головками), поэтому мукор иногда называют «головчатая плесень». После созревания и разрыва спорангия многочисленные эндоспоры заражают все вокруг, попадая на поверхность пищевых продуктов, кормов и окружающие объекты. При благоприятной влажности эндоспоры обильно размножаются на продуктах питания, покрывая всю поверхность черной пушистой массой, видимой невооруженным глазом. Активный рост прекращается при 5–8°C.

К самым известным представителям микомицетов (высших грибов) относятся грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*.

*Penicillium* — плесень кистевик, имеет ветвящийся, септированный мицелий. При микроскопии препаратов из мицелия видны конидиеносцы, имеющие на верхушке мутовки, из которых выходят цепочки конидий (экзоспор). Пенициллы хорошо развиваются при достаточной аэрации и влажности на всех пищевых продуктах. Пустоты внутри и поверхность продуктов покрывается зеленоватой бархатистой плесенью, вызывающей порчу продукта, придающий привкус плесени.

*Aspergillus* — леечная плесень, имеет септированный мицелий. При микроскопии видны конидиеносцы, заканчивающиеся булавовидным расширением, окруженным стеригмами, из которых выходят цепочки конидий. Аспергиллы хорошо развиваются на мясных и молочных продуктах, на поверхности которых появляются колонии зеленой плесени.

**К высшим несовершенным грибам** отнесены микроскопические грибы, у которых половой способ размножения не установлен.

Ниже приведены представители микроскопических грибов, являющихся виновниками порчи пищевых продуктов и кормов.

*Cladosporium* — при микроскопии виден септированный мицелий и конидиеносцы, на питательном субстрате образуют коричневые или черные бархатистые колонии. На воздушных гифах мицелия формируются овальные, расположенные в цепочку споры. Хорошо растут при низких температурах и обладают высокой протеолитической активностью. Находясь на поверхности мяса, мясных продуктах, эта плесень проникает в толщу мышечной ткани.

Плесень этого рода вызывает так называемое внутреннее плесневение масла (образование черных пятен) при наличии внутренних пустот. Может вызвать порчу сыра и яичных продуктов.

*Oidium lactis* — на питательной среде образуют белый септированный мицелий. Оидии в виде овальных клеток отделяются непосредственно от кончиков мицелия. Молочная плесень имеет вид белого пушистого налета, появляется на поверхности молочных продуктов — сметане, твороге, кефире, в результате чего происходит снижение кислотности, приводящее к активизации гнилостных бактерий и порче продукта. При длительном хранении при низкой температуре могут развиваться схожие с *Oidium lactis* другие плесневые грибы, такие как *Candida* и *Oospora*.

*Alternaria* — от основных нитей мицелия гриба отходят короткие конидиеносцы, заканчивающиеся грушевидными или заостренными многоклеточными конидиями,

окрашенными в оливковый, бурый цвет. Плесени этого вида могут развиваться на охлажденном и замороженном мясе, масле и других продуктах.

*Дрожжи* — одноклеточные организмы, округлой или удлинённой формы, с двухконтурной оболочкой и дифференцированным ядром. Размножение дрожжей происходит почкованием, половым путем, а некоторые размножаются при помощи спор. В асках образуется от 4 до 12 спор. Оптимальной является температура 20–30°C, но многие из них способны развиваться и при 10°C.

Дрожжи широко распространены в природе: почве, растениях, в воздухе, откуда они попадают на пищевые продукты. Они являются виновниками порчи пищевых продуктов, в зависимости от вида дрожжей в продуктах происходит сбраживание углеводов, появляется прогорклый вкус у масла. Некоторые виды дрожжей способны развиваться даже в средах с 24% NaCl.

## 9.2. ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Для выращивания микроскопических грибов применяют специальные питательные среды — Сабуро, Чапека, сусло-агар.

При первичном выделении грибов из исследуемого материала в питательные среды для **подавления** сопутствующей микрофлоры добавляют пенициллин из расчета содержания антибиотика 50 или 100 ЕД в 1 мл среды, а стрептомицина — 0,1 г на 1 мл среды. Питательные среды с антибиотиками готовят непосредственно перед использованием, добавляя к расплавленной и охлажденной до 50°C питательной среде растворы антибиотиков. Подозрительный по качеству исследуемый материал (сыр, масло, колбаса, мука, зерно) вносят на поверхность питательной среды в чашке Петри, выращивают при 28°C в течение 5–10 дней. Для каждого вида гриба характерны свои культуральные особенности. Являясь

строгими аэробами, они образуют на поверхности питательной среды бархатистые, войлочные или кожистые колонии различной пигментации. По мере появления колоний изучают морфологические и культуральные свойства для дифференциации плесневых грибов.

### 9.3. ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИИ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

**Методика.** На предметное стекло наносят каплю смеси, состоящей из равных объемов воды, спирта и глицерина. При помощи бактериологической петли и препаровальной иглы в эту каплю вносят часть мицелия изучаемых плесневых грибов, осторожно прикрывают покровным стеклом, находят объект под 8-кратным объективом и изучают под увеличением в 400 раз. Микроскопические грибы не окрашивают — их изучают в нативном виде, поэтому при микроскопии для увеличения контрастности надо опустить конденсор, прикрыть ирисовую диафрагму. При микроскопии обращают внимание на наличие перегородок в мицелии, отмечают особенности строения органов спороношения, так как только по органам спороношения можно определить родовую и даже видовую принадлежность.

*Агар Чапека* рекомендуется применять для выращивания многих видов грибов. Среду готовят следующим образом: на 1000 мл воды добавляют 30 г глюкозы, 2 г нитрата натрия, 1 г дигидрофосфата калия, 0,5 г сульфата магния, 0,5 г хлорида калия, 0,0012 г сульфата железа и 20 г агара.

*Агар Сабуро* применяют при выращивании **возбудителей дерматомикозов и кандидамикозов**. Среду готовят следующим образом: на 1000 мл воды добавляют 40 г глюкозы, 10 г пептона и 18 г агара. После стерилизации рН питательной среды должен быть 6,5.

Для изучения морфологии **дрожжей** на лабораторном занятии используют взвесь пекарских дрожжей в физрастворе, которые равномерно распределяют тонким

слоем на предметном стекле, фиксируют физическим методом и окрашивают метиленовой синью в течение 3–5 мин. Дрожжевые клетки располагаются одиночно, имеют овальную форму, в молодой культуре часто обнаруживают почкующиеся дрожжи. Обратите внимание, препарат можно изучать уже при 400-кратном увеличении, а при изучении культуры дрожжей под иммерсией всегда можно обнаружить сопутствующую бактериальную микрофлору.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Изучить культуральные свойства микроскопических грибов, выросших на питательной среде в чашках Петри. Обратите внимание на особенности мицелия — войлочный, бархатистый; пигмент — зеленый, черный, оливково-бурый.

2. Приготовить препарат из мицелия плесневых грибов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, провести микроскопию, найти органы спороношения, микрокартину зарисовать.

3. Приготовить препарат из взвеси пекарских дрожжей, окрасить простым методом, изучить микрокартину, найти почкующиеся дрожжевые клетки, микрокартину зарисовать.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Характеристика низших и высших микроскопических грибов.

2. Краткая характеристика способов размножения плесневых грибов.

3. Краткая характеристика морфологических признаков дрожжей.

4. С какой целью добавляют антибиотики в питательные среды при культивировании плесневых грибов?

## **СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

**Цель занятия.** Дать представление о сущности серологических реакций, реакции преципитации, реакции агглютинации, антигенах и антителах, о применении серологических реакций в микробиологической практике

**Материалы и оборудование.** Уленгутовские пробирки в штативах. Диагностикумы — преципитирующая сибиреязвенная сыворотка в фабричном флаконе с этикеткой, нормальная сыворотка во флаконе с этикеткой, стандартный сибиреязвенный антиген в ампуле с этикеткой; физраствор в пробирках, пастеровские пипетки, можно градуированные пипетки с тонким капилляром, листок с черным фоном. Компоненты для постановки реакции: пробирки с антигеном № 1 (сибиреязвенный антиген биофабричного приготовления — положительный), пробирки с антигеном № 2 (экстракт из кожевенного сырья — отрицательный).

Для постановки РА на предметном стекле: суточная агаровая сальмонеллезная культура, коробка с поливалентной и набором монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сальмонеллезных сывороток, физиологический раствор в пробирке, бактериологическая петля, предметные стекла, глазные пипетки, спиртотка.

**Таблицы.** Реакция диск-преципитации. Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле.

Свое название серологические реакции получили от латинского слова *serum*, что означает сыворотка крови, являющаяся обязательным компонентом всех серологических реакций. Во всех серологических реакциях происходит физико-химическое взаимодействие между двумя компонентами: антигеном и антителом. Суть серологических реакций заключается в том, что один из компонентов **всегда** неизвестен, так как он находится в исследуемом материале, а второй компонент — всегда известен, так как он биофабричного изготовления, с этикеткой — он получил название «диагностикум». Таким образом, природу неизвестного компонента определяют при помощи **известного диагностикума**. Специфическая реакция между антигеном и антителами происходит в присутствии электролитов, т. е. как в организме животного (*in vivo*). Роль электролита в условиях пробирки (*in vitro*) выполняет 0,85%-ный раствор поваренной соли (известный как физиологический раствор). Все компоненты серологических реакций разводят физиологическим раствором до рабочего титра, указанного на этикетке и в инструкции.

*Антигены* — это высокомолекулярные, генетически чужеродные вещества белковой природы, которые при введении в организм животного вызывают образование антител (иммуноглобулинов (Ig)). В микробиологии к антигенам относятся живые или убитые микроорганизмы, а также продукты их жизнедеятельности — токсины, продукты метаболизма.

В санитарной микробиологии роль антигенов выполняют микроорганизмы, выделенные из исследуемых пищевых продуктов, вид которых можно определить, применяя микроскопические, бактериологические методы исследования (семь признаков которых мы изучили) и серологические реакции. Например, постановкой серологической реакции агглютинации (РА) на предметном стекле с известными поливалентными и монорецепторными агглютинирующими сыворотками.

*Антитела* — специфические белки (иммуноглобулины (Ig)), образующиеся в организме клетками иммун-

ной системы под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться. В результате специфического воздействия антител на антиген и в организме, и в пробирке происходят визуально видимые изменения антигена — он агглютинируется (склеивается), лизируется (растворяется), преципитирует (осаждается), нейтрализуется, т. е., другими словами, он повреждается и разрушается. В зависимости от характера антигена и условий взаимодействия с ним антител, т. е. по изменениям, происходящим с антигеном, в лабораторной практике применяют следующие реакции: реакция преципитации (РП), реакция агглютинации (РА), реакция связывания комплемента (РСК), реакция нейтрализации и др. При этом действие антител строго специфично, они взаимодействуют только с теми антигенами, которые вызвали их появление.

Серологические реакции используются:

1) для определения вида неизвестных бактерий при помощи известных антител, находящихся в диагностической сыворотке (антительный диагностикум с этикеткой);

2) для обнаружения в исследуемой сыворотке крови больного неизвестных антител при помощи диагностикума, содержащего известные бактерии-антигены (антигенный диагностикум с этикеткой).

## 10.1. МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Суть реакции состоит в осаждении или преципитации высокодисперсного антигена под воздействием специфических антител, находящихся в иммунной сыворотке. В результате положительной реакции антиген переходит в грубодисперсное состояние и образует видимый невооруженным глазом «комплекс антиген + антитело» в виде серо-белого кольца, который называется *преципитат*.

Антиген в данной реакции называется *преципитином*, а антитела — *преципитинами*.

В ветеринарной практике реакция преципитации применяется для исследования мяса, кожевенного и мехового сырья, загнившего патологического материала с целью диагностики **сибирской язвы**.

Реакция преципитации применяется также в судебной медицине и ветеринарии для определения видовой принадлежности крови и в ветеринарно-санитарной экспертизе для выявления фальсификации мясных, рыбных продуктов и др. При помощи этой реакции можно определить, из мяса какого вида животных (свиного, говяжьего и др.) приготовлен тот или иной мясной продукт.

Реакция преципитации была разработана Асколи (1910) в основном для исследования кожевенного сырья на сибирскую язву, т. е. для выявления неизвестных микробных антигенов при помощи известных антител. Для ее проведения необходимы следующие компоненты.

1. Экстракт из исследуемого сырья — это компонент РП, содержащий неизвестный антиген, находящийся в растворимом, высокодисперсном состоянии. Этот компонент можно приготовить двумя методами.

*Холодный способ.* Измельчают 1 г кожи (кожи, мяса), растирают в ступке со стерильным речным песком, переносят каждую пробу отдельно в пробирку, заливают 9 мл карболизированного физиологического раствора и экстрагируют 16–18 ч в условиях холодильника при 4–6°C.

*Горячий способ.* 1–2 г материала измельчают, помещают в пробирку, заливают 9 мл физиологического раствора и экстрагируют в кипящей водяной бане 30 мин (этот метод применяют в экстренных случаях).

Затем полученные экстракты фильтруют через асбестовую вату — экстракт должен быть прозрачным, так как он является **высокодисперсным, некорпускулярным**. Экстракт даже со следами незначительного помутнения надо перефильтровать. В экстракте, полученном из материала больных животных (кожи, мяса), содержится сибиреязвенный антиген в высокодисперсном состоянии, наличие которого надо доказать.

2. Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка во флаконе с фабричной этикеткой содержит известные антитела. Эту сыворотку получают на предприятиях биологической промышленности путем гипериммунизации лошадей-продуцентов, которым многократно (10–13 раз) вводят возбудитель сибирской язвы (антиген) с интервалом в 3–7 дней в возрастающих дозах от 5 до 70 мл. Через 14 дней после последнего введения антигена у лошадей берут кровь в количестве 5–6 л, отделяют от нее прозрачную сыворотку, содержащую антитела и получившую название «гипериммунная преципитирующая сыворотка». Гипериммунную специфическую сыворотку консервируют добавлением 0,5% фенола, отстаивают в течение 2 мес., стерилизуют фильтрованием и разливают в стерильные флаконы (50 мл) с этикеткой. Это известный компонент реакции преципитации содержит противосибиреязвенные антитела, при помощи которых определяют наличие и природу неизвестного антигена.

3. 0,85% -ный раствор поваренной соли (физраствор) рН 7,2–7,4.

4. Для контроля — специфический сибиреязвенный антиген, прозрачный экстракт возбудителя сибирской язвы (биофабричный), в ампулах с этикеткой.

5. Для контроля — нормальная сыворотка без антител, полученная от здоровых животных, в ампулах с этикеткой.

### 10.1.1. Методика постановки РП методом наслаивания

В специальные уленгуттовские пробирки по стенке наливают 0,2–0,3 мл преципитирующей сыворотки так, чтобы на внутренней стенке пробирки осталась мокрая дорожка. Именно по этой дорожке осторожно **наслаивают** маленькими капельками в таком же объеме исследуемый экстракт-антиген. При правильном наслаивании должна получиться четкая граница между двумя компонентами.

В положительном случае антитела вступают с антигеном в специфическую связь, образуют комплекс «антиген + антитело», антиген под действием специфических антител преципитирует (осаждается), изменяя свое физико-химическое состояние, переходя из невидимого высокодисперсного состояния в грубодисперсное. Комплекс имеет вид четкого кольца на границе двух компонентов. При учете реакции штатив с пробирками держат на уровне глаз и просматривают в проходящем свете на черном фоне.

Реакция считается положительной, если на границе сыворотки и экстракта через 3–8 мин появляется серо-белое кольцо; сомнительной — если кольцо появится через 10–15 мин и отрицательной — при отсутствии кольца.

Любая серологическая реакция должна сопровождаться контролем качества компонентов, наличием положительного и отрицательного эталона.

1. Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка + фабричный специфический антиген, реакция должна наступить через 1–2 мин (это эталон положительной реакции).

2. Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка + физиологический раствор (это эталон отрицательной реакции).

3. Нормальная сыворотка + экстракт из исследуемой кожи (реакция отрицательная).

Кроме этой реакции кольцепреципитации, применяются следующие модификации: реакция диск-преципитации, реакция диффузионной преципитации в агаровом геле.

## **10.2. МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РА НА ПРЕДМЕТНОМ СТЕКЛЕ**

*Агглютинацией* называется склеивание микробных клеток под воздействием антител, находящихся в иммунной сыворотке.

Антиген, вступающий в РА, носит название *агглютиноген*, антитела — *агглютинины*, а комплекс «антиген + антитело», образующийся в результате положительной реакции агглютинации, — *агглютинат*.

Реакция агглютинации в микробиологической практике применяется для диагностики бруцеллеза, листериоза, сальмонеллеза, колибактериоза.

Реакция агглютинации протекает в две фазы.

**Первая фаза** — специфическая, невидимая, когда происходит образование комплекса «антиген + антитело».

**Вторая фаза** — неспецифическая, в процессе которой изменяется физико-химическое состояние реакционной жидкости и образуются видимые хлопья агглютината.

Агглютинация происходит при температуре 37°C в растворе электролитов (в физиологическом растворе) при рН 7,2–7,4.

Различают следующие виды агглютинации.

1. *О-агглютинация соматическая*, когда происходит склеивание неподвижных, не имеющих жгутики микробов. О-агглютинация протекает медленно, в результате положительной реакции образуются мелкие комочки агглютината.

2. *Н-агглютинация жгутиковая*, когда происходит склеивание подвижных, имеющих жгутики бактерий. Н-агглютинация протекает быстрее, в результате положительной реакции образуются крупные хлопья агглютината.

Выбор метода постановки РА зависит от вида исследуемого материала и цели исследования. Наиболее распространенными методами постановки РА являются:

- классическая развернутая, пробирочная РА в объеме 1 мл, когда в исследуемой сыворотке животного или человека определяют наличие специфических антител при помощи антигенного диагностикума. Наличие специфических антител в исследуемой сыворотке позволяет поставить положительный диагноз;
- капельная РА на предметном стекле, когда определяют вид выделенного возбудителя при помощи специфической агглютинирующей сыворотки (антительного диагностикума).

### 10.2.1. Капельный метод РА на предметном стекле

Его в основном применяют для быстрого определения вида, для идентификации культур бактерий, а также для установления принадлежности к определенным серогруппам. Рассмотрим методику постановки РА на предметном стекле на примере определения вида сальмонелл.

Для постановки РА на предметном стекле необходимы следующие компоненты.

1. Чистая, суточная культура неизвестного вида бактерий на косом МПА в пробирке, по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам предварительно должна быть отнесена к бактериям семейства *Enterobacteriaceae* (т. е. у изучаемой культуры уже изучили первые 5–7 признаков).

2. Антительный диагностикум — набор поливалентных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сальмонеллезных сывороток в фабричной упаковке с этикетками, с инструкцией.

3. Пробирка с физраствором рН 7,2–7,4 с пипеткой.

Капельную РА на предметном стекле для определения родовой и видовой принадлежности сальмонелл ставят по следующей методике в три этапа.

**1-й этап.** Для определения родовой принадлежности сальмонелл на предметное стекло наносят каплю поливалентной сальмонеллезной агглютинирующей сыворотки и отдельно каплю физиологического раствора (для исключения самоагглютинации). В каждую каплю вносят часть снятой с агара колонии, которую, начиная с периферии капли, тщательно растирая до гомогенного состояния, соединяют с сывороткой, полученную взвесь подогревают над пламенем спиртовки до 37°C (не более!). Если сыворотка и бактериальная культура друг другу специфичны, то через 2–3 мин происходит агглютинация бактериальных клеток — бактерии склеиваются в виде хлопьев, реакционная жидкость при этом просветляется. В зависимости от того, подвижная культура или без жгутиков, агглютинат будет иметь разный

вид: подвижные виды бактерии образуют крупные хлопья агглютината (Н-агглютинация), а неподвижные — мелкие комочки (О-агглютинация). Контрольная капля с физиологическим раствором должна оставаться равномерно мутной.

**2-й этап.** После определения родовой принадлежности переходят к определению серогруппы сальмонелл. Для этого необходимо поставить РА на предметном стекле с О-агглютинирующими сыворотками серогрупп А, В, С, D, Е по методике описанной выше. На предметное стекло наносят по капле сыворотки всех серогрупп, и в каждую каплю вносят часть колонии изучаемой культуры по вышеописанной методике. Положительная РА должна получиться только в одной капле, например с сывороткой серогруппы С, а в нее входят виды *S. choleraesuis* и *S. typhisuis*.

**3-й этап.** Для окончательного определения вида сальмонелл необходимо продолжить исследование и поставить РА на предметном стекле с Н-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками, которые входят в фабричный набор сывороток.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Познакомиться с фабричными компонентами для постановки РП: гипериммунной преципитирующей сибиреязвенной сывороткой и сибиреязвенным антигеном.

2. Освоить методику постановки РП с положительно и отрицательно реагирующим кожевенным сырьем методом наслаивания. Провести учет результатов реакции преципитации, поставленной методом наслаивания и оценить качество сырья.

3. Поставить РА на предметном стекле для идентификации сальмонеллезной культуры при помощи поливалентной и О- и Н-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Понятие об антигенах и антителах.
2. С какой целью применяются серологические реакции?
3. Какие изменения происходят с антигеном под действием специфических антител в РА, в РП?
4. Какие видимые проявления реакции появляются при положительной и отрицательной РА?
5. Какие видимые проявления реакции появляются при положительной и отрицательной РП?

## **ПРИНЦИП ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ. ВАКЦИНЫ, ГИПЕРИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

**Цель занятия.** Ознакомить студентов с принципами приготовления биологических препаратов, применяемых в ветеринарной практике: вакцинами, лечебно-профилактическими и диагностическими сыворотками, антигенами, аллергенами, а также методами контроля их качества.

**Материалы и оборудование.** Вакцины против сибирской язвы, туберкулеза, бруцеллеза, лептоспироза, ботулизма. Лечебно-профилактические иммунные сыворотки, диагностические агглютинирующие сыворотки и антигенные диагностискумы, диагностические аллергены — бруцеллин, туберкулин.

*Вакцины* — это биологические препараты, содержащие микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, которые применяют для активной иммунизации с целью создания иммунитета (невосприимчивости) организма к определенным инфекционным болезням. Различают вакцины живые и инактивированные (корпускулярные), а также химические и анатоксины (некорпускулярные).

*Живые вакцины* представляют собой **взвесь** бактерий, приготовленных из аттенуированных возбудителей, ослабленных ультрафиолетовыми лучами, длительным выращиванием на искусственных питательных средах иногда в присутствии ингибитора и т. д. В результате целенаправленного воздействия микроорганизмы, потеряв вирулентность, должны сохранить антигенные и иммуногенные свойства.

*Убитые вакцины* обычно готовят из **взвеси** вирулентных и иммуногенных штаммов бактерий, поэтому в процессе приготовления вакцин их инактивируют. Для инактивирования бактерий используют высокую температуру или химические вещества, в основном применяют формалин, добавляя от 0,2 до 0,5%, в зависимости от биологических особенностей микроорганизмов. Выращивание бактериальной массы для живой и убитой вакцины проводят в жидкой обогащенной питательной среде в котлах-реакторах, аэрируемых подаваемым кислородом. После накопления максимальной концентрации бактериальная масса отделяется от жидкой части путем центрифугирования. Полученная бактериальная масса служит основой для получения вакцин. Концентрацию бактерий в 1 мл готовой вакцины доводят до 4 млрд при помощи стандартного эталона мутности, фотометрически подогнанного к мутности определенной концентрации бактерий.

Для усиления процессов иммуногенеза в вакцины в процессе изготовления стерильно добавляют адьюванты. Это различные химические вещества органической и неорганической природы: гидроокись алюминия, алюмокалиевые квасцы, ланолин, сапонин. Они создают на месте введения «депо» и усиливают гуморальный и клеточный иммунный ответ на введенный антиген.

Приготовленную вакцину проверяют на **стерильность, безвредность и активность (иммуногенность)**. Все инактивированные препараты должны быть **стерильными**. Для контроля на стерильность из препарата делают высеv на МПА, МПБ, МППБ и среды для выяв-

ления микроскопических грибов. При высеве из живой вакцины должна вырасти только одна культура, указанная на этикетке. Важнейшим элементом контроля на безвредность является проверка вакцины на лабораторных животных. Обычно используют от 3 до 5 животных на каждую серию изготовленной партии. Вакцина безвредна, если у привитых животных она не вызывает никаких патологических симптомов. Активность (иммуногенность) определяют следующим методом: животных иммунизируют испытуемой вакциной, через две недели иммунизированным и контрольным животным вводят смертельную дозу культуры микробов, за ними наблюдают в течение определенного времени. Иммунизированные животные должны остаться живыми и здоровыми, а контрольные — погибнуть.

*Химические вакцины* представляют собой антигенные комплексы, извлеченные из микробной клетки и очищенные от балластных иммунизирующих веществ.

*Анатоксины* — экзотоксин, утративший свою токсичность, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства. Широко применяемыми анатоксинами являются вакцины против столбняка и ботулизма. При приготовлении столбнячного анатоксина к фильтрату токсинсодержащей бульонной культуры добавляют 0,5% формалина, инактивируют при 39°C в течение 30 сут, затем концентрируют удалением 80% надосадочной жидкости и добавляют алюмокалиевые квасцы. Контроль качества биопрепарата проводят по обычным параметрам.

Все флаконы с биопрепаратами должны быть опечатаны и снабжены этикетками, на которых указывают наименование препарата, биофабрику, дату выпуска, срок годности, серию, номер госконтроля, дозировку.

**Иммунные сыворотки и иммуноглобулины** выпускаются предприятиями биологической промышленности. В качестве продуцентов иммунных сывороток используют лошадей, мулов, ослов, волон и реже другие виды животных. Гипериммунизацию проводят нарастающими дозами антигенов по утвержденным производственным схемам, отличающимся продолжительностью иммуни-

зации, интервалами между циклами иммунизации, дозами для каждого цикла введения антигена и реакцией продуцента.

После окончания цикла иммунизации, когда в сыворотке крови животных-продуцентов находится максимальное количество специфических антител, у животных частично или тотально берут кровь. Кровь помещают в термостат для свертывания, при этом отделяется прозрачная сыворотка, ее отсасывают и стерилизуют, пропуская через бактериальные фильтры. Сыворотку консервируют, добавляя 0,25–0,5% фенола, разливают во флаконы с этикеткой.

Гипериммунные сыворотки применяют для лечебных и профилактических целей, они создают у животных лишь кратковременный пассивный иммунитет. Иммунитет после введения сыворотки наступает в ближайшие часы, но не превышает 2–3 недель.

Безвредность каждой серии сывороточных препаратов проверяют на лабораторных животных, которым подкожно вводят 10 мл сыворотки. Животные должны оставаться здоровыми, без выраженных проявлений местной и общей реакции.

Специфическую активность сывороточных препаратов определяют с помощью реакции биологической нейтрализации: чем меньше доза сыворотки, способная нейтрализовать действие определенной дозы токсина, тем выше ее активность.

Контроль бактериальной чистоты сывороточных препаратов проводят по общепринятой методике посевами из препарата на специальные питательные среды (МПА, МПБ, МППБ и на агар Сабуро).

**Диагностические антительные диагностикумы** выпускают предприятия биологической промышленности. Антительные диагностикумы применяют как известный компонент в серологических реакциях при определении вида возбудителя, выделенного из исследуемого материала.

**Диагностические антигенные диагностикумы** готовят на предприятиях биологической промышленности по принципу приготовления инактивированных вакцин. Например, приготовление бруцеллезного антигенного диагностикума проводят по следующей методике: на обогащенном печеночном агаре выращивают бруцеллезную биомассу из вакцинного штамма № 19, инактивируют нагреванием, устанавливают концентрацию 10 млрд микробных тел в 1 мл, консервируют фенолом, разливают во флаконы с этикеткой. Применяют как известный компонент при исследовании сыворотки крови на бруцеллез в РА, РСК.

Сальмонеллезный антигенный диагностикум представляет собой 10-миллиардную взвесь сальмонелл. Его применяют как компонент при постановке серологической реакции при диагностике сальмонеллеза.

Стандартный сибиреязвенный антиген для РП представляет собой прозрачный экстракт из убитых нагреванием бацилл сибирской язвы, применяют для контроля качества компонентов при постановке РП при исследовании кожевенного сырья, мяса на сибирскую язву.

**Аллергены** выпускают предприятия биологической промышленности. Представляют собой экстракты из бактериальной массы, **не должны обладать антигенными** свойствами. Аллергены применяют для аллергической диагностики туберкулеза (туберкулин), бруцеллеза (бруцеллин), сибирской язвы (антраксин) и др.

Туберкулин готовят путем выращивания культур микобактерий туберкулеза человеческого вида на мясопептонном глицериновом бульоне в течение 6–8 недель. Затем культуру автоклавируют, выпаривают до 1/10 объема, фильтруют через бактериальные фильтры Зейтца и добавляют 50% глицерина от общего объема. Контроль качества аллергена включает в себя установление стерильности и специфической активности. Специфическую активность проверяют на здоровых и реагирующих на аллерген животных параллельно со стандартным аллергеном.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Ознакомиться с биопрепаратами фабричного изготовления. Провести классификацию биопрепаратов по применению.

2. Дать краткую характеристику вакцинным препаратам, гипериммунным сывороткам, антигенным и антительным диагностикумам.

3. Вскрыть флакон с убитой вакциной и провести посев на МПА, МПБ, МППБ, агар Чапека для контроля качества биопрепаратов.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. По каким признакам проводят классификацию биопрепаратов?

2. Какие требования предъявляют к живым аттенуированным вакцинам?

3. Какие требования предъявляют к инактивированным вакцинам?

4. Методика получения гипериммунных сывороток.

5. С какой целью применяются антигенные и антительные диагностикумы?

6. По каким параметрам проводят контроль качества биопрепаратов?

**САНИТАРНО-  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ  
ЛАБОРАТОРИЯ И ЕЕ ОБОРУДОВАНИЕ.  
ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ  
И РЕЖИМ РАБОТЫ.  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ  
ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА\***

**Цель занятия.** Познакомиться с санитарно-микробиологической лабораторией, изучить ее оборудование и правила в ней. Получить представление о микрофлоре воздуха, источниках загрязнения. Овладеть методами бактериологического исследования микрофлоры воздуха.

**Материалы и оборудование.** Для исследования воздуха: аппарат Кротова, чашки Петри с МПА и средой Чапека.

---

\* Микробиологические исследования по всем лабораторным темам проводятся согласно ГОСТ РФ.

## 12.1. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ И ЕЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Санитарно-микробиологическая лаборатория состоит из нескольких помещений:

- комнаты для бактериологических исследований;
- лаборатории для приготовления и розлива питательных сред;
- автоклавной, в которой проводится стерилизация питательных сред и обеззараживание отработанных бактериальных культур и посуды (автоклавы должны быть отдельные и маркированные);
- моечной — для мытья лабораторной посуды;
- складских помещений для хранения посуды, сухих питательных сред, реактивов;
- регистратура для приема исследуемого материала (анализов);
- кабинет для заведующего;
- виварий для содержания лабораторных животных строят отдельно.

Лабораторные комнаты для проведения бактериологических исследований должны быть просторные — на каждое рабочее место должно приходиться  $7,5 \text{ м}^2$ . В комнате выделяется площадь для одного или двух застекленных до потолка боксов с предбоксниками, в которых ведется работа, требующая асептических условий, где исключено движение воздуха. В боксах для обеззараживания воздуха УФ-лучами применяются специальные бактерицидные лампы, из расчета  $1,5\text{--}2,5 \text{ Вт}$  на  $1 \text{ м}^3$  бокса. Стены, пол и потолок должны быть облицованы плиткой, устойчивой к влажной обработке дезраствором. Лабораторные столы должны быть покрыты пластиком, чтобы их можно было обрабатывать дезинфицирующими растворами. В боксе за 30 мин до начала и после окончания работы включают бактерицидные лампы. На каждом рабочем месте бактериолога должны быть: бактериальная петля, спиртовки, штатив для пробирок, предметные и покровные стекла, карандаши по стеклу, набор красок, сливная

чаша с мостиком, банки с дезраствором, микроскоп с иммерсионным объективом, иммерсионное масло, набор пастеровских и градуированных стерильных пипеток.

Воздух в боксе не менее двух раз в неделю следует проверять на бактериальную загрязненность. Для этого чашки Петри с МПА и средой Сабуро оставляют открытыми на 15 мин, а затем посев на МПА выдерживают в термостате 48 ч при 37°C, а чашки со средой Сабуро — 96 ч при 22°C. Допускается наличие 5 колоний в чашках.

### 12.1.1. Правила и режим работы

В санитарно-микробиологических лабораториях соблюдается такой же режим работы, как и в других микробиологических лабораториях, где работают с инфицированным материалом. С поступившим исследуемым материалом следует работать как с потенциальным источником опасности для здоровья человека. Поэтому все сотрудники должны соблюдать правила, обеспечивающие стерильность в работе, исключая возможность внутрилабораторного заражения и распространения патогенных бактерий за пределы лаборатории. В связи с этим приняты следующие правила.

1. Вся лабораторная работа должна проводиться в спецодежде (халат, шапочка). Спецодежду нельзя носить вне лаборатории.

2. Запрещается входить в лабораторию без халата, выходить в нем за пределы лаборатории и надевать на халат верхнюю одежду.

3. Двери лаборатории должны быть закрыты.

4. В помещении лаборатории запрещается хранить посторонние вещи, принимать пищу, курить.

5. Все манипуляции (обработка материала, посевы, вскрытие ампул, фильтрование, центрифугирование) необходимо выполнять осторожно, не допуская образования аэрозолей.

6. Запрещается насасывание исследуемого материала ртом, необходимо пользоваться специальными приспособлениями, исключающими попадание микробов в рот.

7. По окончании работы сотрудники должны убрать рабочее место, провести дезинфекцию поверхности стола. Отработанный материал и загрязненную посуду убирают в контейнер для автоклавирования. Пробирки и чашки с посевами помещают в термостат. Руки по окончании работы дезинфицируют и моют с мылом.

8. В случае аварии в лаборатории проводят дезинфекцию. Остатки стеклянной посуды захватывают пинцетом и погружают в дезраствор.

9. В лаборатории ежедневно проводят влажную уборку с применением дезинфицирующих растворов.

## 12.2. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА

С санитарно-микробиологической точки зрения воздух представляет собой среду, в которой микроорганизмы не способны размножаться. В воздухе нет питательных веществ и влаги, солнечные лучи оказывают бактерицидное действие. Тем не менее в воздухе постоянно имеются пигментообразующие кокки, споры бактерий, плесеней и актиномицетов.

Болезнетворные микробы попадают в воздух с пылью из почвы и с выделениями больных людей и животных. Воздух помещений загрязняется во время сухой уборки, чихания и кашля. При этом капли аэрозоли, находящиеся в воздухе, служат источником аэрогенного заражения окружающих. Скорость оседания капель зависит от диаметра аэрозоля.

Бактериальные аэрозоли делят на три фазы.

1. *Крупнокапельная фаза* с диаметром частиц аэрозоля более 0,1 мм. Длительность пребывания таких частиц в воздухе — несколько секунд, капли быстро оседают.

2. *Капельно-ядерная фаза*, имеющая диаметр частиц 0,1 мм и менее. Частицы длительно находятся в воздухе и рассеиваются на большие расстояния с потоками воздуха. С ней рассеиваются различные микроорганизмы, в том числе и патогенные.

3. *Фаза бактериальной пыли* имеет частицы разного диаметра от 1 до 0,001 мм. Эта фаза имеет наибольшее эпизоотологическое и эпидемиологическое значение, так как она длительно находится во взвешенном состоянии и глубоко проникает в дыхательные пути. Аэрогенным путем инфекционные заболевания передаются главным образом в закрытых помещениях.

Выживаемость патогенных микроорганизмов, находящихся во взвешенном состоянии, зависит от биологических свойств возбудителя, а также температуры и влажности воздуха. Например, возбудители туберкулеза, сибирской язвы, хорошо переносящие высыхание, длительное время сохраняются в окружающей среде.

Микробиологическое исследование воздуха проводят для определения МАФАНМ (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов), т. е. общего микробного числа и количества санитарно-показательных микроорганизмов. МАФАНМ в воздухе определяют посевом на поверхность МПА; количество санитарно-показательных микробов определяют посевом на кровяном агаре, желточно-солевом агаре. Для определения наличия спор плесеней и дрожжей используют сусло-агар или среду Сабуро, Чапека.

Существует много методов бактериологического исследования воздуха. Самыми доступными и чаще применяемыми являются методы Коха и Кротова.

### 12.2.1. Седиментационный метод Коха

Суть метода заключается в **осаждении** микробных частиц и капель аэрозоли на поверхность плотной питательной среды под действием силы тяжести.

**Методика.** Чашки Петри с МПА, средой Сабуро оставляют открытыми на 5–20 мин в исследуемом помеще-

нии (классе, в цехах молочного завода, мясокомбината и т. д.). Чашки закрывают и помещают в термостат при 30°C, если это МПА или кровяной агар, их культивируют в течение 48 ч; если это среда Сабуро — культивируют при 25°C в течение 4–7 сут. Затем проводят подсчет выросших колоний во всей чашке.

После подсчета выросших колоний в чашке Петри определяют количество микроорганизмов в 1 м<sup>3</sup> воздуха по формуле Омелянского, согласно которой в чашки с питательной средой площадью 100 см<sup>2</sup> в течение 5 мин оседает столько микробных клеток, сколько их содержится в 10 л воздуха:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{S \cdot 10 \cdot T},$$

где  $X$  — количество микробов в 1 м<sup>3</sup> (1000 л) воздуха;  $a$  — количество выросших колоний в чашках;  $S$  — площадь чашки (80 см<sup>2</sup>); 5 — время экспозиции по правилу Омелянского;  $T$  — время, в течение которого чашка была открыта; 10 — 10 л воздуха по правилу Омелянского; 1000 — 1 м<sup>3</sup> воздуха; 100 — 100 см<sup>2</sup> питательной среды.

### 12.2.2. Аспирационный метод Кротова

Этот метод является более точным, так как прибор снабжен микроанометром, показывающим (объем) количество литров посеянного воздуха. Аппарат Кротова — это цилиндрический прибор, внутри которого имеется электромотор с центробежным вентилятором. При вращении вентилятора из исследуемого помещения воздух засасывается через узкую клиновидную щель в крышке прибора. Под крышкой прибора находится вращающаяся платформа с чашкой Петри, струя воздуха ударяется о поверхность питательной среды, микроорганизмы из воздуха оседают. Чашки с посевами помещают в термостат на 24–48 ч при 37°C. Подсчет колоний производят так же, как и при седиментационном методе. В дальнейшем число микробов в 1 м<sup>3</sup> воздуха определяют по формуле

$$X = \frac{a \cdot 1000}{n},$$

где  $X$  — число микробов в  $1 \text{ м}^3$  воздуха;  $a$  — число выросших колоний;  $1000$  —  $1 \text{ м}^3$  воздуха;  $n$  — количество посеянного воздуха.

Требования, предъявляемые к микробиологическим показателям воздуха, представлены в таблице 7.

Таблица 7

**Микробиологические нормативы санитарного состояния  
воздуха производственных помещений  
(исследуют один раз в месяц)**

Метод исследования	МАФАНМ, КОЕ, не более	Плесневые грибы, КОЕ, не более
Метод Коха	200 колоний за 20 мин	20 колоний за 20 мин
Метод Кротова	150 колоний в 100 л	15 колоний в 100 л

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Провести посев воздуха класса в чашки с МПА методом Коха для определения количества МАФАНМ.
2. Провести посев воздуха класса методом Кротова для определения количества МАФАНМ. Чашки с посевами поставить в термостат.
3. На следующем занятии провести подсчет выросших колоний и определить количество МАФАНМ в  $1 \text{ м}^3$ .

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чем заключается сущность исследования воздуха методом осаждения по Коху?
2. В чем заключается преимущество метода Кротова?
3. Какие микроорганизмы, находящиеся в воздухе, относятся к санитарно-показательным?

## **САНИТАРНО- МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ**

**Цель занятия.** Дать общее представление о микрофлоре почвы, источниках загрязнения. Овладеть различными методами бактериологического исследования почвы.

**Материалы и оборудование.** Образцы почвы в пакетиках по 1 г, стерильный физраствор по 9 мл в пробирках, стерильные пипетки по 1 мл, стерильные чашки Петри, расплавленный МПА в пробирках столбиком, пробирки со средой Кесслера, агар Эндо в чашках Петри.

Почва является естественной средой обитания многих видов микроорганизмов. В ней имеются все условия для благоприятного их развития: достаточное количество влаги, органических и минеральных веществ. Почвенные микроорганизмы участвуют в минерализации органических отходов, самоочищении почвы, в круговороте веществ в природе.

В почву с выделениями больных, а также с трупами животных, погибших от инфекционных болезней, со сточными водами попадают патогенные микроорганизмы. В связи с этим почва может служить источником распространения возбудителей инфекционных болезней, через почву загрязняются объекты окружающей среды, может происходить обсеменение сапрофитными и болезнетворными микроорганизмами сырья животного происхождения, пищевых продуктов, кормов.

В составе микрофлоры почвы принято выделять так называемые физиологические группы микроорганизмов, которые участвуют в различных процессах и на разных этапах постепенного разложения органических веществ, к которым относятся:

- 1) аммонификаторы (гнилостные);
- 2) нитрифицирующие бактерии;
- 3) азотфиксирующие;
- 4) бактерии, расщепляющие клетчатку;
- 5) бактерии, участвующие в круговороте серы, железа, фосфора.

В почве могут быть и патогенные бактерии, продолжительность их выживания зависит от вида и условий внешней среды. Особое место занимают спорообразующие возбудители почвенных инфекций (сибирской язвы, злокачественного отека, эмфизематозного карбункула, столбняка, ботулизма), которые сохраняются в почве годами, а возбудитель сибирской язвы — десятки и сотни лет.

Краткий санитарно-микробиологический анализ почвы включает определение следующих показателей:

- количество МАФАнМ в 1 г;
- коли-титра почвы;
- в отдельных случаях в почве определяют наличие возбудителей сибирской язвы для исключения старых сибиреязвенных захоронений. Например, при строительстве детских лагерей, новых животноводческих помещений и т. д.

**Отбор проб почвы.** На обследуемой территории до 1000 м<sup>3</sup> выделяют два участка по 25 м<sup>2</sup> каждый: один участок выбирают вблизи, другой — вдали от источника загрязнения. С каждого участка отбирают среднюю пробу, составленную из 5 образцов, взятых по диагонали. Образцы берут на глубине до 20 см, при исследовании почвы скотомогильников — ниже глубины захоронения не менее чем на 25 см. Пробы отбирают стерильной железной лопатой или специальным буром в стерильные широкогорлые банки, которые закрывают ватными пробками. К банке приклеивают этикетку с датой и номером образца.

Масса каждого образца должна быть 200–300 г, а смешанного — не менее 1 кг. Отобранные пробы почвы направляют в лабораторию и исследуют сразу же или не позднее чем через 12–18 ч при обязательном хранении в холодильнике.

### 13.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАФАНМ В 1 Г ПОЧВЫ МЕТОДОМ СЕРИЙНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

**Методика.** В производственных лабораториях в колбу емкостью 500 мл наливают 270 мл стерильной водопроводной воды и вносят 30 г исследуемой почвы, затем колбу с содержимым встряхивают в течение 10 мин. Из полученного разведения почвы  $1:10^{-1}$  готовят последующие десятикратные разведения: для чистых почв от  $1:10^{-2}$  до  $1:10^{-4}$ , для загрязненных — до  $1:10^{-6}$  и больше.

В учебном классе удобнее делать разведения в пробирках, для этого первое разведение готовят внесением 1 г исследуемой почвы в пробирку с 9 мл стерильной воды, из полученного первого разведения  $1:10$  переносят 1 мл во вторую пробирку с 9 мл воды, получается разведение  $1:100$ , и т. д. до  $10^6$  (в результате этих разведений уменьшается концентрация бактерий и при посеве в чашки Петри появятся изолированные колонии, подсчет которых облегчается).

Из двух последних разведений почвы ( $10^{-5}$  и  $10^{-6}$ ) берут по 1 мл и переносят в стерильные чашки Петри (не менее двух чашек на каждое разведение), которые заливают 13 мл расплавленного и охлажденного до  $50^{\circ}\text{C}$  МПА и тщательно перемешивают (метод горячей заливки). Посевы культивируют в термостате 24–48 ч при  $30^{\circ}\text{C}$ .

Учету подлежат чашки Петри, в которых выросло от 30 до 300 колоний. Колонии считают в каждой чашке отдельно, определяют среднеарифметическое число по двум чашкам. Полученное число колоний умножают на степень разведения исследуемой почвы и получают число бактерий в 1 г почвы.

## 13.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА ПОЧВЫ МЕТОДОМ БРОДИЛЬНЫХ ПРОБ

Определение коли-титра почвы методом бродильных проб с использованием среды Кесслера проводят в три этапа. На первом этапе готовят разведения: для чистых почв от  $1:10^{-1}$  до  $1:10^{-3}$ ; для загрязненных — от  $1:10^{-3}$  до  $1:10^{-6}$ . После тщательного перемешивания 1 мл полученной суспензии из различных разведений переносят в пробирки со средой Кесслера с поплавками. Посевы культивируют при  $43^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч (при такой температуре дает рост кишечная палочка только теплокровных).

На втором этапе исследования просматривают посевы на среде Кесслера. Из пробирок с наличием газа делают высев на среду Эндо штрихом, для получения изолированных колоний. Посевы культивируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 ч.

На третьем этапе исследуют колонии, выросшие на среде Эндо. Для этого отмечают и отбирают изолированные колонии, типичные для бактерий БГКП, готовят из них мазки, красят по Граму, микроскопируют. При обнаружении в мазках коротких грамотрицательных палочек проводят высев из этих колоний на среду Кесслера для подтверждения газообразования в чистой культуре.

В таблице 8 приведены санитарно-микробиологические показатели почвы, имеющей различную микробную загрязненность.

Таблица 8

Санитарно-бактериологические показатели почвы

Оценка почвы	Общее количество бактерий в 1 г	Коли-титр почвы
Относительно чистая	Менее 10 тыс.	Выше 1
Умеренно загрязненная	Сотни тысяч	1–0,01
Сильно загрязненная	Миллионы	0,01–0,001

Особую трудность представляет выделение сибиреязвенных спор из почвы, так как в ней находится огромное количество различных микроорганизмов, в том числе спорообразующих сапрофитных аэробов. Существующие бактериологические методы не всегда позволяют выделить возбудителя сибирской язвы из почвы. Основная трудность состоит в отделении спор от частиц почвы. Из многих известных методов более надежным является метод предварительной подготовки пробы почвы по следующей методике:

1) 100 г исследуемой почвы заливают 5–10-кратным объемом стерильного фосфатного буфера или воды;

2) шуттелируют взвесь в течение 20–30 мин, с последующим отстаиванием в течение 5–8 мин;

3) фильтрование через 2–3 слоя марли;

4) прогревание полученной суспензии в водяной бане в течение 30 мин при 70°C для уничтожения сопутствующей вегетативной микрофлоры;

5) посев суспензии на поверхность МПА в чашках Петри для получения изолированных колоний, а из них чистой культуры;

6) полученной культурой заражают 5–10 белых мышей, подкожно в дозе 0,1–0,2 мл;

7) вскрытие павших мышей и выделение чистой культуры возбудителя сибирской язвы из органов трупа.

Для выделения чистой культуры возбудителя сибирской язвы из исследуемого материала, загрязненного посторонней микрофлорой, предложены селективные среды, в состав которых вводят 200–500 ЕД/мл полимиксина в сочетании с триметопримом, которые подавляют рост мезофильных бактерий *B. subtilis*, *B. cereus* и *E. coli*.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести бактериологическое исследование различных образцов почвы методом серийных разведений для определения количества МАФАНМ посевом в чашки Петри. Чашки поставить в термостат.

2. На следующем занятии провести подсчет количества выросших колоний, определить количество МАФАнМ в 1 г исследуемой почвы.

3. Провести демонстрацию посева исследуемых образцов почвы в среды Кесслера для определения колититра.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Перечислите правила отбора проб почвы.
2. В чем заключается суть метода серийных разведений при определении количества МАФАнМ?
3. В чем заключается суть определения колититра исследуемой почвы?
4. С какой целью добавляют в питательные среды полимиксин и триметоприм при выделении чистой культуры сибирской язвы?

## **САНИТАРНО- МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ**

**Цель занятия.** Овладеть различными методами исследования количественного и качественного состава микрофлоры воды.

**Материалы и оборудование.** Пробы водопроводной и речной воды, чашки Петри, расплавленный МПА в пробирках высоким столбиком, стерильные пипетки на 1 мл, стерильный физраствор по 9 мл. Для демонстрации: прибор Зейтца с колбой Бунзена, водоструйный вакуумный насос, мембранные фильтры № 3, среда Эндо в чашках, глюкозопептонные среды (ГПС) с индикатором и поплавками, разлитые в пробирки и колбы. Колбы и пробирки с ГПС с посевами воды для демонстрации метода бродильных проб с положительными результатами.

**Таблицы.** Схема определения коли-титра воды.

Вода является естественной средой обитания многих микроорганизмов. Особую опасность для здоровья человека и животных представляют патогенные бактерии, которые могут быть в воде.

Источниками загрязнения воды патогенными микроорганизмами являются выделения больных животных и людей, трупы животных, сточные воды, особенно предприятий, перерабатывающих животное сырье и др. Длительность выживания патогенных микробов в воде

зависит от их вида, условий окружающей среды и может составлять от нескольких часов до нескольких лет. Так, возбудитель сибирской язвы может сохраняться в воде до 3 лет, возбудитель туберкулеза до одного года, а бруцеллы — до 100 дней. Имеется группа болезней, для которых характерен водный путь распространения (паразиты, лептоспирозы).

Таким образом, вода может стать источником распространения инфекционных болезней, возникновения эпидемий и эпизоотий. Для санитарно-бактериологической оценки воды проводят следующие исследования:

- 1) определение общего микробного числа или МАФАНМ в 1 мл;
- 2) определение коли-титра (КТ) и коли-индекса (КИ);
- 3) обнаружение в воде патогенных микроорганизмов проводят по эпидпоказаниям.

При санитарно-микробиологических исследованиях пробы воды забирают из источника в объеме не менее 500 мл. Из открытых водоемов пробу воды отбирают батометром. Батометр — стерильная емкость с пробкой в металлическом каркасе и свинцовым грузилом. На нужной глубине пробку открывают, подтягивая ее за веревочку. Воду из рек, озер отбирают с глубины 10–15 см от поверхности, а при небольшой глубине — на расстоянии 10–15 см от дна.

Для отбора проб водопроводной воды из крана набирают 500 мл в стерильные колбы с ватной пробкой с соблюдением правил асептики. Кран предварительно стерилизуют обжиганием горящим спиртовым тампоном, затем в течение 10 мин спускают воду. Пробы воды исследуют тотчас или не позднее 2 ч с момента взятия, если это невозможно, то хранят не более 6 ч обязательно при 1–5°C в холодильнике.

**Определение количества МАФАНМ в водопроводной воде.** В чашку Петри с соблюдением правил асептики вносят 1 мл водопроводной воды без предварительного разведения, заливают расплавленным и охлажденным до 50°C МПА (методом горячей заливки). Посевы инкубируют 24–48 ч в термостате при 30°C. После указанно-

го срока приступают к подсчету количества колоний, выросших как на поверхности, так и в глубине агара. Учитывают только те разведения, при посеве которых на чашках вырастает от 30 до 300 колоний. При посеве воды без разведений количество бактерий в 1 мл воды будет равно количеству выросших колоний.

**Определение количества МАФАНМ в воде открытых водоемов.** Исследуемую воду, учитывая ее загрязненность, предварительно разводят **стерильной** водой в зависимости от предполагаемого загрязнения от  $1:10^{-1}$  до  $1:10^{-4}$ , из двух последних разведений вносят по 1 мл в стерильные чашки и заливают расплавленным и охлажденным до  $50^{\circ}\text{C}$  МПА. После инкубирования при  $30^{\circ}\text{C}$  в термостате в течение 24–48 ч подсчитывают количество колоний, умножают на степень разведения воды и определяют количество бактерий в 1 мл воды открытых водоемов.

## 14.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА И КОЛИ-ИНДЕКСА ВОДЫ

*Коли-титром* (КТ) называют наименьший объем воды, в котором обнаружена одна кишечная палочка.

*Коли-индекс* (КИ) показывает число кишечных палочек в 1000 мл воды.

Кишечная палочка является постоянным обитателем кишечника человека и животных, следовательно, ее присутствие в питьевой воде является индикатором фекального загрязнения. Чем выше концентрация бактерий группы кишечной палочки, тем вероятнее присутствие в исследуемой воде таких бактерий, как сальмонеллы, возбудители дизентерии и холеры. Показатели КТ и КИ указывают на санитарное состояние воды, ее пригодность в качестве питьевой.

При исследовании чистой воды удобнее пользоваться методом мембранных фильтров, при исследовании воды, содержащей механические частицы, затрудняю-

щие процесс фильтрации, лучше пользоваться бродильным методом.

Коли-титр и коли-индекс определяют двумя методами:

- 1) метод бродильных проб;
- 2) метод мембранных фильтров.

#### 14.1.1. Метод бродильных проб

Суть этого метода заключается в посеве определенных объемов исследуемой воды в среды накопления с индикатором и поплавками, инкубации ее при 37°C с последующим пересевом из забродивших пробирок на среду Эндо, дифференциацией выросших колоний и вычисления коли-титра воды по нормативам.

Этот метод основан на ферментативной способности бактерий группы кишечной палочки (БГКП) расщеплять при помощи ферментов лактозу или глюкозу до кислоты и газа. Исследуемая вода засеивается в различных объемах в глюкозопептонную среду (ГПС) с индикатором и поплавками, при наличии кишечной палочки появляется помутнение, меняется цвет индикатора (желтый цвет переходит в красный) и появляются пузырьки газа в поплавках. Воду методом бродильных проб исследуют в три этапа.

**Первый день.** Засеивают водопроводную воду в объеме 333 мл (три объема по 100 мл, три — по 10 мл и три — по 1 мл). При этом вода в объемах по 100 и 10 мл засеивается в колбы и пробирки с 10 и 1 мл концентрированной ГПС (в 1 л воды растворяют 100 г пептона, 50 г хлорида натрия, рН 7,4, разливают по 10 мл в колбы емкостью 250 мл с поплавками и по 1 мл в пробирки с поплавками, стерилизуют при 112°C), а посев воды в объеме 1 мл — в пробирки с 10 мл среды с нормальной концентрацией (готовят как концентрированную, но количество всех ингредиентов, кроме воды, уменьшают в 10 раз). Посевы воды в средах ГПС культивируют в термостате 24 ч при 37°C.

**Второй день.** Учет результатов посева разных объемов воды:

- отсутствие помутнения, образования кислоты и газа в колбах и пробирках после посева воды свидетельствуют об отсутствии кишечной палочки в исследуемом объеме воды;
- наличие кишечной палочки вызывает помутнение питательной среды, изменение цвета индикатора (красный цвет переходит в желтый) и появление пузырька газа в поплавках. Из каждого забродившего посева петлей делают пересев штрихом на агар Эндо в чашках Петри таким методом, чтобы появились изолированные колонии. Посевы культивируют 24 ч при 37°C.

**Третий день.** Учет результатов посева на агаре Эндо. При отсутствии роста на агаре Эндо или при наличии колоний, нехарактерных для БГКП, дается отрицательный ответ.

Из колоний, характерных для бактерий БГКП (красных с металлическим оттенком), готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. Изучают культуру по оксидазному тесту. Для этого на фильтровальную бумагу, пропитанную раствором нафтола-диэтил-*n*-фенилендиамина, наносят штрихом 2–3 колонии, снятые с агара Эндо. Для кишечной палочки характерно: наличие грамотрицательных палочек в мазке и отсутствие изменений в окраске фильтровальной бумаги на оксидазный тест, т. е. кишечная палочка относится к оксидазоотрицательным бактериям. При положительном результате на оксидазный тест бумага, пропитанная индикатором, приобретает ярко-синюю окраску (в течение минуты), положительную реакцию дают БГКП, которые не учитываются.

Наличие в мазках грамотрицательных бактерий с отрицательной реакцией на оксидазный тест позволяет дать положительный ответ на присутствие БГКП в исследуемом объеме воды. Полученные результаты сравнивают с нормативами на питьевую воду (табл. 9).

Таблица 9

**Определение коли-титра и коли-индекса бактерий кишечных палочек при исследовании воды**

Количество положительных результатов анализа воды			Коли-индекс	Коли-титр
из трех флаконов по 100 мл	из трех флаконов по 10 мл	из трех флаконов по 1 мл		
1	2	3	4	5
0	0	0	< 3	> 333
0	0	1	3	333
0	1	0	3	333
1	0	0	4	250
1	0	1	7	143
1	1	0	7	143
1	1	1	11	91
1	2	0	11	91
2	0	0	9	111
2	0	1	14	72
2	1	0	15	67
2	1	1	20	50
2	2	0	21	48
2	2	1	28	86
3	0	0	23	43
3	0	1	39	26
3	0	2	64	16
1	2	3	4	5
3	1	0	43	23
3	1	1	75	13
3	1	2	120	8
3	2	0	93	11
3	2	1	150	7
3	2	2	210	5
3	3	0	240	4
3	3	1	460	2
3	3	2	1100	0,9
3	3	3	> 1100	< 0,9

Для установления свежего фекального загрязнения делают посев воды в желчно-лактозную среду с бриллиантовым зеленым. Посевы культивируют при 43°C для дифференциации кишечной палочки от хладнокровных, не растущих при такой высокой температуре. Наличие мути и газа указывает на присутствие в воде бактерий — показателей свежего фекального загрязнения.

### 14.1.2. Метод мембранных фильтров

Суть этого метода заключается в концентрировании бактерий из определенного объема исследуемой воды на поверхности мембранных фильтров и выращиванием их на поверхности агара Эндо и последующим учетом количества БГКП в 1 л воды. Метод мембранных фильтров экономичнее и дает возможность дать ответ на 2-й день.

**Первый день.** Готовят прибор Зейтца — протирают спиртовым тампоном, обжигают в пламени спиртовки металлические детали. Готовят мембранные фильтры № 3 из нитроцеллюлозы, с диаметром пор 0,7 мкм, которые задерживают на своей поверхности БГКП. Фильтры кипятят 10–15 мин в дистиллированной воде, затем с соблюдением правил асептики при помощи пинцета с гладкими кончиками фильтр матовой поверхностью вверх кладут на сетку фильтрационного прибора Зейтца. В воронку прибора наливают исследуемую воду, а в приемной колбе Бунзена создают вакуум при помощи водоструйного насоса. Исследуемая вода фильтруется через мембранный фильтр, бактерии, находившиеся в ней, остаются на поверхности. После окончания фильтрации воды мембранный фильтр матовой стороной вверх переносят на поверхность агара Эндо в чашках Петри (на одной чашке можно разложить четыре фильтра). Чашки ставят в термостат при 37°C на сутки. Через поры мембранного фильтра происходит диффузия питательных компонентов среды Эндо, вследствие этого оставшиеся БГКП размножаются и за сутки на поверхности фильтра каждая палочка образует типичные колонии — красные

с металлическим оттенком, количество которых подсчитывают.

Водопроводная вода засеивается (фильтруется) в объеме 333 мл, которые последовательно пропускают через четыре фильтра по 200, 100, 30 и 3 мл воды.

**Второй день.** Учитывают наличие или отсутствие колоний на поверхности фильтров, находящихся на агаре Эндо в чашках Петри.

Отсутствие колоний на поверхности фильтра или наличие колоний, нехарактерных для БГКП, позволяет дать отрицательный ответ на присутствие кишечной палочки в исследуемом объеме воды.

При наличии на фильтре колоний, характерных для БГКП, красных с металлическим блеском, исследование продолжают. Для этого готовят препараты из подозрительных колоний, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении грамтрицательных палочек ставят оксидазную пробу.

Отрицательная проба на оксидазу свидетельствует о наличии в воде кишечной палочки, которая учитывается. В этом случае вычисляют коли-титр и коли-индекс. Результат выражают в виде коли-индекса, определяемого суммированием числа колоний кишечных палочек, выросших на поверхности всех мембранных фильтров из всех проб воды, и пересчета этого количества на 1000 мл воды. Зная показатель коли-титра, можно определить коли-индекс: для перевода коли-титра в коли-индекс 1000 делят на показатель коли-титра, а для перевода коли-индекса в коли-титр 1000 делят на число, выражающее коли-индекс.

Например, при исследовании пробы воды профильтровано 3 объема по 100 мл. На первом фильтре выросло 3, на втором фильтре выросло всего 2 колонии, на третьем — 10 колоний, т. е. в общей сложности на трех фильтрах выросло 15 колоний.

Коли-титр этой воды будет равен:

$$300/15 = 20 \text{ мл,}$$

т. е. 20 мл — это наименьший объем воды, в котором находится одна кишечная палочка.

Теперь, зная коли-титр, мы определяем коли-индекс по формуле:

$$\text{коли-индекс воды} = \frac{1000}{\text{коли-титр}} = \frac{1000}{20} = 50;$$

$$\text{коли-титр} = \frac{1000}{\text{коли-индекс}} = \frac{1000}{50} = 20.$$

Таким образом, коли-индекс исследуемой воды равен 50, т. е. в 1000 мл воды находится 50 кишечных палочек, такой водой пользоваться нельзя, так как коли-индекс питьевой воды должен быть не более 3.

Требования к санитарно-микробиологическому состоянию воды представлены в таблице 10.

Таблица 10

**Микробиологические нормативы  
санитарного состояния воды**

Объект контроля	Количество МАФАнМ, КОЕ, не более	Коли-титр, не менее	Коли-индекс, не более	Периодичность контроля
Вода водопроводная	100 в 1 мл	333	3	Один раз в месяц
Вода открытых водоемов	1000 в 1 мл	111	9	—

Для питьевой воды установлены следующие нормативы бактериологических показателей:

- количество МАФАнМ в 1 мл — не более 100;
- коли-титр — не менее 333;
- коли-индекс не должен превышать 3 кишечных палочек в 1000 мл.

Вода открытых водоемов считается доброкачественной, если количество МАФАнМ не более 1000, коли-титр — не менее 111, коли-индекс — не более 9.

Наличие в воде патогенных бактерий устанавливают путем посева на дифференциально-диагностические и элективные питательные среды с последующей их идентификацией методами, принятыми в микробиологии.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести отбор воды из водопроводного крана в учебном классе.

2. Сделать посев водопроводной и речной воды методом горячей заливки в чашки Петри для определения количества МАФАНМ в 1 мл.

3. Провести демонстрацию посева водопроводной воды в ГПС для определения коли-титра воды методом бродильных проб.

4. Провести демонстрацию фильтрации водопроводной воды через фильтр Зейтца для определения коли-индекса методом мембранных фильтров.

5. На демонстрационных посевах провести учет коли-титра исследуемой водопроводной воды.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Назовите источники загрязнения воды патогенными микроорганизмами.

2. Почему кишечная палочка отнесена к санитарно-показательным микроорганизмам?

3. В чем суть определения коли-титра воды методом бродильных проб?

4. В чем суть определения коли-титра и коли индекса воды методом мембранных фильтров?

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА МЯСА ЖИВОТНЫХ**

**Цель занятия.** Овладеть методами бактериологического контроля технологического процесса производства мяса. Провести исследование на индикацию возбудителя сибирской язвы, сальмонеллеза и наличие кишечной палочки.

**Материалы и оборудование.** Образцы мяса различной степени свежести, стерильные ступки, скальпель, ножницы, пинцеты. Весы, разновески, стерильные листы бумаги для взвешивания мяса. Набор красок для окраски по Граму, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, баночки со спиртом. Для бактериологического исследования мяса: петли, чашки с МПА, среды обогащения, селективные среды — Эндо, Левина, Плоскирева, ВСА.

**Таблица.** Определение свежести мяса.

Мышцы здоровых животных и птиц не содержат микроорганизмы. Загрязнение мяса микробами начинается в момент убоя. Кровь, вытекающая из артерий, отчасти засасывается вновь через вены, зияющие в ране и имеющие отрицательное давление. Обсеменение поверхности мяса происходит при снятии шкуры и разделке туши. Особенно сильно загрязняется мясо, если при

обработке туши повреждают кишечник. Дальнейшее загрязнение поверхности мяса происходит при его транспортировке и хранении. Микроорганизмы, попавшие в мясо, при благоприятной температуре могут размножаться, поскольку этот продукт является хорошей питательной средой, количество их на 1 см<sup>2</sup> поверхности мяса может достигать многих миллионов.

Гарантией доброкачественности и эпидемической безопасности мяса и мясных продуктов на этапе их продвижения от предприятия к потребителю является ветеринарный и санитарно-микробиологический контроль. Бактериологическое исследование мяса проводят во всех случаях, предусмотренных НТД (научно-технической документацией), правилами ВСЭ и другими нормативными актами.

Бактериологическое исследование мяса и мясопродуктов проводят во всех случаях, предусмотренных правилами ветеринарно-санитарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов, а именно:

- во всех случаях вынужденного убоя животных, независимо от причин убоя;
- при желудочно-кишечных болезнях, при тяжело протекающих заболеваниях органов дыхания;
- микробиологическое исследование мяса проводят во всех случаях, когда предполагают обсеменение возбудителями зооантропонозов или пищевых токсикоинфекций и токсикозов;
- при удалении кишечника из туши позже 2 ч после убоя животного.

На бактериологическое исследование должно быть направлено мясо, если невозможно определить пригодность его в пищу по результатам органолептического исследования, а также по ряду физико-химических показателей. При наличии обильного микробного обсеменения мяса, установленного в результате микроскопии мазков-отпечатков, т. е. при сомнении в отношении пригодности мяса и невозможности определить пригодность его в пищу путем ветеринарно-санитарного осмотра.

Чаще на поверхности мясных туш находятся стафилококки и микрококки, молочнокислые бактерии, бактерии группы кишечных палочек, различные виды гнилостных аэробных бацилл и анаэробных клостридий, дрожжи и споры плесневых грибов.

## 15.1. ОТБОР ПРОБ

В зависимости от предполагаемого диагноза и характера патологоанатомических изменений в микробиологический отдел от каждой туши направляют пробы мышц, лимфатических узлов и внутренних органов.

Каждую пробу завертывают отдельно, помещают в общую упаковку, на которой ставят дату отбора образцов, номер туши. Тару с образцами опечатывают или опломбируют.

В сопроводительном документе указывают: вид и количество мяса, номера образцов, адрес хозяйства, причину исследования, дату и подпись направившего. Пробы охлажденных продуктов транспортируют при температуре от 0 до 2°C. Пробы мяса, предназначенные для микробиологического анализа, исследуют непосредственно при поступлении их в лабораторию.

Микробиологический контроль мяса и мясопродуктов проводят для определения количества МАФАНМ, бактерий группы кишечной палочки, возбудителей зооантропонозов, обнаружения сальмонелл, палочки протей, токсичных стафилококков и патогенных анаэробов — в случае сомнений в отношении пригодности мяса и невозможности определить пригодность его в пищу путем ветеринарно-санитарного осмотра.

Исследование мяса состоит из следующих этапов:

- 1) органолептическая оценка мяса;
- 2) микроскопическое исследование препаратов, приготовленных из мяса, окрашенных по Граму, на капсулу и споры;
- 3) первичный посев на среды обогащения и селективные среды;

4) идентификация выделенных культур по морфологическим, культурально-биохимическим и антигенным свойствам;

5) заражение лабораторных животных в необходимых случаях.

Продолжительность бактериологического исследования мяса 3 сут, при постановке биопробы — до 10 сут. Исследуемые туши после взятия проб помещают в холодильник-изолятор при температуре 0–4°C.

1. Органолептическая оценка мяса. Доброкачественное мясо имеет сухую корочку подсыхания бледно-красного цвета. На разрезе оно плотное, эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает. Несвежее мясо покрыто плотной, темно-красной или ослизненной корочкой. Консистенция его мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании ямка медленно восстанавливается. Поверхность испорченного мяса ослизненная, консистенция дряблая, мажущаяся; жир слизистый с прогорклым запахом — такое мясо бракуют.

2. Для микроскопического исследования мяса из каждой пробы готовят препараты-отпечатки для окрашивания по Граму, на наличие капсул — по Ольту или Михину. В каждом препарате изучают не менее 25 полей зрения.

На предметных стеклах делают по два препарата-отпечатка — один с поверхностного, другой — из глубинного слоя. Для приготовления препарата-отпечатка из поверхностного слоя стерильными ножницами вырезают кусочек (0,5–1 г) и прикладывают только что срезанной стороной к поверхности обезжиренного, профламбированного предметного стекла.

Для приготовления препарата-отпечатка из глубинных слоев поверхность мяса прижигают шпателем, стерильным ножом делают надрез в этой области и из глубины вырезают кусочек весом 0,5–1 г, которым делают препарат-отпечаток на стекле. Препараты подсушивают на воздухе, фиксируют физическим или химическим методом, окрашивают по Граму и микроскопируют, под-

считывают количество микроорганизмов в каждом поле зрения, учитывая отдельно шаровидные и палочковидные формы (данные приведены в табл. 11).

Таблица 11

## Оценка свежести мяса микроскопическим методом

Степень свежести мяса	pH мяса	Микроскопические показатели
Свежее	5,9–6,5	Единичные кокки или палочки. На стекле нет остатков ткани
Сомнительной свежести	6,6	До 20–30 кокков, единичные палочки. На стекле видны следы распавшейся мышечной ткани
Несвежее (непригодное)	6,7	Множество палочек, на стекле слой распавшейся мышечной ткани

Препарат из **свежего** мяса окрашивается обычно плохо. Если он получен из поверхностного слоя мяса, то в поле зрения встречаются единичные палочки и кокки. В препаратах из глубоких слоев они или отсутствуют, или встречаются не во всех полях зрения.

Препарат из мяса **сомнительной свежести** окрашивается удовлетворительно, видны следы распада мышечной ткани. При просмотре в каждом поле зрения обнаруживается несколько десятков кокков и палочек. Особенно много их в мазках, приготовленных из поверхностных слоев.

Препарат-отпечаток из мяса, непригодного в пищу, окрашивается хорошо. В поле зрения в препаратах, как из поверхностных, так и из глубинных слоев, встречается по несколько десятков микробов с преобладанием палочек. При сильном разложении мяса кокки почти отсутствуют, все поле зрения состоит из палочек. Среди них могут быть кишечные палочки, флуоресцирующие бактерии, спорообразующие бактерии (из аэробных спорообразующих бактерий — *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*; из факультативно-анаэробных — *Proteus vulgaris*, из анаэробных — *Cl. putrificus*, *Cl. sporogenes*).

## Определение количества МАФАНМ

**Методика.** Исследуемый образец мяса перед посевом освобождают от видимой жировой и соединительной ткани, погружают на 2–3 мин в этиловый спирт и обжигают поверхность. Затем стерильными ножницами из глубины различных мест каждого образца вырезают кусочки размером не менее  $2 \times 1,5 \times 2,5$  см. Лимфатические узлы разрезают пополам.

Все кусочки измельчают с соблюдением правил асептики, для посева составляют две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая — из кусочков паренхиматозных органов (печени, почки и селезенки).

Каждую пробу в отдельности помещают в стерильный стакан гомогенизатора, добавляют по 15 мл физиологического раствора и гомогенизируют в электрическом гомогенизаторе не более 2–3 мин (при этом 1 мл приготовленной взвеси содержит 0,5 г продукта). При отсутствии гомогенизатора взвесь готовят в фарфоровых ступках, растирая пестиком измельченные ножницами образцы в течение 2–3 мин.

Для получения первого разведения 1:10 нужно 1 мл гомогенизированной массы, содержащей 0,5 г нативного продукта, внести в пробирку с 4 мл стерильного физраствора (4,5 мл жидкости + 0,5 г продукта). Полученные взвеси отстаивают 10 мин. Из верхней части надосадочной жидкости с разведением 1:10 готовят ряд последовательных разведений 1:100, 1:1000 и т. д. Один грамм мяса и по 1 мл из каждого разведения вносят параллельно в две чашки Петри, заливают расплавленным и охлажденным до  $50^{\circ}\text{C}$  МПА. Каждую чашку тщательно и осторожно перемешивают, охлаждают, переворачивают вверх дном и инкубируют в термостате 24–48 ч при  $30^{\circ}\text{C}$ . Чтобы определить количество мезофильных бактерий в 1 г мяса, подсчитывают количество всех колоний в двух параллельных посевах, определяют среднеарифметическое число и умножают на степень разведения.

Для вычисления среднего арифметического нельзя использовать посева, где количество выросших колоний на чашках менее 30.

При отсутствии роста колоний результаты фиксируют, таким образом: «Количество микроорганизмов менее одного».

Если при посевах оказалось, что во всех разведениях на засеянных чашках менее 30 колоний, в результате анализа рекомендуется написать: «Рост единичных колоний при посеве» и указать количество засеянного продукта.

Если на чашках, более чем на 1/2 их площади, имеется расползающийся рост спорообразующих микроорганизмов, подсчет изолированных колоний невозможен, в результате анализа следует написать: «Рост спорообразующих микроорганизмов».

Результаты выражают в колониеобразующих единицах — КОЕ (мл, г).

Чашки с первичными посевами на плотных средах просматривают визуально, при необходимости — через лупу. Обращают внимание на колонии, характерные для возбудителей сибирской язвы, рожи свиней, пастереллеза, листериоза, кокковых инфекций, а также напоминающих рост микроорганизмов, вызывающих пищевые отравления у людей.

Мясо оценивают в соответствии с Санитарными правилами и нормами, в 1 г парного мяса допускается не более 10 КОЕ/г МАФАнМ (колонии образующих единиц), в охлажденных и переохлажденных отрубках — не более 1000 КОЕ/г МАФАнМ.

### **Индикация кишечной палочки**

Для выявления наличия БГКП в определенной навеске мяса готовят исходное и ряд 10-кратных разведений на физрастворе с таким расчетом, чтобы в посевах на плотных питательных средах получить изолированные колонии. Затем по 1 мл различных разведений вносят

в жидкие селективные питательные среды (бульон лактозный с бриллиантовым зеленым и желчью или в среду Кесслера). Посевы выдерживают в термостате при 37°C, предварительный учет проводят через 24 ч, окончательный — через 48 ч по интенсивному росту микроорганизмов, признаками которого являются помутнение среды, образование газа, изменение цвета индикатора (в результате подкисления pH).

Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к БГКП проводят высев 0,1 мл культуральной жидкости на одну из дифференциально-диагностических сред (Эндо, Смирнова). Инкубируют в термостате в течение 24 ч. На агаре Эндо они образуют красные колонии с металлическим блеском (и без), на среде Смирнова — желтые колонии с изменением среды в тот же цвет. Для более быстрого получения результатов разрешено проводить первичный посев 0,1 мл исходного или 10-кратного разведения непосредственно на плотные питательные среды, что позволяет сделать заключение о наличии (отсутствии) БГКП в определенной навеске продукта через 24 ч. Для этого отбирают чашки с посевами, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний. Не менее чем из пяти колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают морфологические и тинкториальные свойства.

Одновременно с изучением морфологических, культуральных, ферментативных свойств проводят серологическую типизацию культур эшерихий. Серологическую типизацию культур эшерихий проводят при помощи набора типоспецифических агглютинирующих О-копи сывороток. По классификации, утвержденной Международным номенклатурным комитетом в 1964 г., род эшерихий представлен одним видом *E. coli*, который насчитывает около 160 сероваров.

В 1 г парного мяса в соответствии с Санитарными правилами и нормами, бактерии группы кишечной палочки не допускаются.

При идентификации выделенных культур следует иметь в виду, что эшерихии — грамотрицательные палочки, спор и капсул не образуют, подвижны, ферменти-

руют лактозу и маннит, не разжижают желатин, не выделяют сероводород и образуют индол, не утилизируют цитраты и не растут на среде Симмонса, дают положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную — Фогеса — Проскауэра, не расщепляют мочевины.

### Индикация сальмонеллезной палочки

На основании результатов анализа определяют наличие (отсутствие) сальмонелл и их количество в навеске продукта массой 25 г. Для этого готовят измельченную навеску продукта массой 25 г, вносят ее в колбу с 225 мл среды обогащения (селенитовый бульон, тетратионатная среда) с последующим выдерживанием в термостате соответственно при 37 или 42°C в течение 24–48 ч.

Следует иметь в виду, что на селенитовом Ф-бульоне *S. typhisuis* и *S. cholerae suis*, как правило, не растут. *S. cholerae suis* растет лучше на среде Киллиана.

При появлении роста на средах обогащения из них делают пересев на плотные селективно-диагностические среды в чашках Петри (агар Эндо, Левина, ВСА) по секторам для получения изолированных колоний. Посевы выдерживают в термостате 24 ч при 37°C, исследуют на наличие колоний, по своим характеристикам подозрительных на сальмонеллы.

Сальмонеллы, как не ферментирующие лактозу микроорганизмы, в подавляющем большинстве случаев дают типичный рост на дифференциально-диагностических средах:

- на Эндо (фуксин-сульфитный агар) — круглые, бесцветные колонии;
- на среде Левина — прозрачные, нежно-розовые колонии;
- на среде Смирнова — прозрачные, серовато-фиолетовые колонии;
- среде Плоскирева — бесцветные колонии, но более плотные и меньшего размера, чем на среде Эндо;

- на висмут-сульфитном агаре (ВСА), который применяется для целенаправленного выделения сальмонелл, как правило, они образуют черные или коричневые колонии с темным ореолом.

При этом наблюдается прокрашивание участка среды в черный цвет. Исключение составляют некоторые серологические типы из группы С, в частности *S. typhisuis*, растущие на ВСА в виде светло-зеленых колоний. Кишечная палочка на этой среде обычно не растет.

Из подозрительных на сальмонеллы колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, изучают культуральные и ферментативные свойства. У всех подозрительных культур определяют антигенную структуру, устанавливают род и идентифицируют до вида.

Сальмонеллы — грамотрицательные палочки, подвижные, за исключением *S. pullorum-gallinarum*, не ферментируют лактозу и сахарозу, расщепляют глюкозу и манит, выделяют сероводород, не образуют индол.

В заключении указывают, обнаружены или отсутствуют сальмонеллы в 25 г исследуемого мяса. В таблице 12 представлены микробиологические показатели мяса и мясопродуктов.

Таблица 12

**Микробиологические показатели мяса и мясопродуктов**

Группа продуктов	МАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		
		БГКП	СРК	патогенные МО, в том числе сальмонеллы
<b>Мясо свежее (все виды убойных животных)</b>				
Парное в отрубях (полутуши, четвертины)	10	10	—	25
Охлажденное и переохлажденное в отрубях	1000	0,1	—	25

Продолжение табл. 12

Группа продуктов	МАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		
		БГКП	СРК	патоген- ные МО, в том числе сальмо- неллы
<b>Мясо замороженное (все виды убойных животных)</b>				
В отрубях (полутуши)	$1 \cdot 10^4$	0,01	—	25
Блоки из жилованного мяса (говядина, свинина, баранина)	$5 \cdot 10^5$	0,001	—	25
<b>Полуфабрикаты мясные натуральные</b>				
Фарш свежий	$5 \cdot 10^6$	0,001	—	25
<b>Субпродукты убойных животных (охлажденные, замороженные)</b>				
Печень, почки, язык, мозги, сердце	—	—	—	25

Мясо и мясопродукты после проведения микробиологического анализа оценивают в соответствии с Санитарными правилами и нормами (СанПиН), по которым в 25 г мяса не допускается присутствие патогенных бактерий, в том числе сальмонеллы, листерии.

## 15.2. ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ УСЛОВНО ГОДНОГО МЯСА

Обеззараживанию подлежат мясо и мясопродукты, которые не могут быть выпущены без предварительной обработки. Мясо и мясопродукты, подлежащие обеззараживанию провариванием, варят кусками массой не более 2 кг и толщиной до 8 см в открытых котлах в течение 3 ч, а в закрытых котлах — при  $112^{\circ}\text{C}$  в течение 2,5 ч. Мясо считается обеззараженным, если в толще куска температура достигла  $80^{\circ}\text{C}$ .

Во всех случаях, когда перерабатывают мясо, подлежащее обеззараживанию, по окончании работы тщательно дезинфицируют помещение, оборудование и тару. Аппаратуру, использованную при переработке мяса, промывают горячим 5%-ным раствором соды кальцинированной или другими препаратами согласно действующим инструкциям.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Приготовить препарат-отпечаток из исследуемого мяса, окрасить по Граму, изучить под иммерсионным объективом, оценить качество мяса.

2. Сделать посев исследуемого мяса в МПА, на агар Эндо, Левина и Плоскирева.

3. На следующем занятии изучить культуральные свойства колоний, появившихся после посева. Обратит внимание на колонии, характерные по культуральным свойствам на возбудителя сибирской язвы, рожи свиней, листериоза, возбудителей кокковых инфекций.

4. На следующем занятии провести идентификацию колоний, типичных для сальмонелл, путем постановки РА на предметном стекле с поливалентными и О- и Н-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. В каких случаях проводится бактериологическое исследование мяса?

2. Перечислите правила отбора проб мяса для исследования.

3. Какая микрокартина характерна для мяса, непригодного в пищу?

4. В чем заключается суть методики определения количества МАФАНМ в мясе?

5. На чем основана индикация в мясе БГКП и сальмонелл?

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА МЯСА КУР**

**Цель занятия.** Овладеть методами бактериологического контроля технологического процесса производства мяса кур.

**Материалы и оборудование.** Тушки или окорочка куриного мяса, стерильные ступки, скальпели, ножницы, пинцеты. Весы, разновески, мензурки, спиртовки, стерильные листы бумаги для взвешивания мяса. Стерильный физраствор в колбах по 500 мл и в пробирках по 9 мл, стерильные пипетки на 1 и 2 мл. Бактериологические петли, набор красок для окраски по Граму, предметные стекла, микроскопы, иммерсионное масло. Питательные среды: МПА, агар Эндо и Левина, ВСА в чашках Петри.

Для анализа мяса здоровой птицы от партии отбирают не менее трех тушек. Каждую тушку в отдельности упаковывают в полиэтиленовую пленку или пергаментную бумагу, опечатывают и составляют акт с указанием наименования предприятия, вида птицы, размера партии и других данных. С момента отбора и до начала исследования образцы хранят при температуре 0–2°C не более 24 ч.

Отбор проб от каждой тушки проводят одним из трех методов:

- методом вырезания кусочков мышц из различных участков;
- методом смыва со всей поверхности тушки смывной стерильной водой;
- методом смыва с поверхности тушки тампоном.

*Метод вырезания кусочков мышц* используют для выявления сальмонелл, а также для определения других микробиологических показателей тушки. Из области грудной части, голени и бедра вырезают на всю глубину мышцы в равных количествах. Масса отобранной пробы должна быть 100–150 г. Всю пробу измельчают ножницами с соблюдением правил асептики, растирают в фарфоровой ступке пестиком, перемешивают и получают объединенную пробу одной тушки или полутушки. 25 г продукта используют для исследования на сальмонеллы, а 10 г продукта — для приготовления серии десятикратных разведений для определения МАФАНМ.

Для оценки санитарного состояния производства используют *метод смыва со всей поверхности тушки* смывной стерильной водой и *метод смыва тампоном*. В смывах определяют МАФАНМ, споры клостридий и бацилл, а также другие микроорганизмы по показаниям производства (наличие сальмонелл в смывах не определяют).

Отбор проб методом смыва стерильным тампоном применим к потрошеным тушкам любой массы. Смыв осуществляют с разных участков.

С тушек крупной птицы общая площадь смывной поверхности должна составлять 100 см<sup>2</sup> (по трафарету), смыв проводят 2–5 тампонами, которые помещают в колбу со 100 мл стерильной жидкости и встряхивают в течение 2 мин. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом для приготовления последовательных десятикратных разведений. Расчет количества микроорганизмов проводят на 1 см<sup>2</sup> поверхности тушки.

Отбор проб потрохов и бескостного кускового мяса проводят следующим методом: от партии продукта каждого наименования отбирают точечные пробы (по 10–50 г), среднюю пробу массой не менее 150 г помещают в стерильную посуду. Измельчают, тщательно перемешивают

и взвешивают навеску 25 г для посева на сальмонеллы и 10 г для приготовления десятикратных разведений (для приготовления первого разведения к 10 г измельченной массы добавляют 90 мл стерильной воды).

При микробиологическом исследовании мышечных желудков и кускового мяса, кроме выделения сальмонелл, рекомендуется отбор проб методом смыва в полимерном пакете. Для этого среднюю пробу продукта одного наименования массой не менее 150 г помещают в новый пакет, взвешивают и добавляют стерильную смывную воду в количестве, равном массе пробы. Встряхивают 2 мин и 1 мл смывной жидкости используют для серии последовательных десятикратных разведений.

Расчет количества микроорганизмов определяют в 1 г продукта или в 1 мл смывной жидкости по массе, равной массе пробы продукта.

Для выделения микроорганизмов из мяса птицы, субпродуктов и полуфабрикатов используют верхний слой надосадочной жидкости, а для определения их количества — взвесь исходного разведения.

Микробиологический анализ проводят на наличие мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ), бактерий группы кишечных палочек (БГКП), сальмонелл, сульфитредуцирующих клостридий (СРК), протей, золотистого стафилококка, микробиологические показатели, по которым для птицеводческой продукции регламентированы СанПиН (Санитарные правила и нормы).

### **Методика определения количества МАФАНМ методом смыва со всей тушки**

Его проводят следующим образом: тушку массой не более 1,5 кг помещают в стерильный пакет из полимерных материалов, наливают стерильную воду в количестве, равном массе тушки (т. е. 1500 мл), встряхивают содержимое пакета в течение 2 мин. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом, из которого готовят серию десятикратных разведений по общепри-

нятой методике, для определения количества МАФАНМ в 1 мл смыва. Из соответствующих разведений делают посев по 1 мл одновременно в две чашки Петри, заливают 15 мл расплавленного, охлажденного до 50°C МПА с глюкозой. Питательную среду тщательно размешивают круговыми движениями чашки по поверхности стола для равномерного распределения посевного материала и получения изолированных колоний. Чашки с посевами ставят в термостат вверх дном, чтобы предотвратить размывание выросших колоний конденсатом, образующимся на внутренней поверхности крышки, выдерживают в термостате при 30°C в течение 72 ч.

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. При этом подсчитывают все выросшие колонии, учитывают чашки, в которых количество колоний составляет 30–300. По результатам подсчета вычисляют среднее арифметическое значение количества колоний из всех посевов одного разведения.

Количество микроорганизмов в 1 г продукта или 1 мл смывной жидкости определяют по формуле

$$X = a \cdot 10^n \frac{(m + V)}{m \cdot V},$$

где  $a$  — среднее арифметическое количество колоний в посевах;  $n$  — число десятикратных разведений навески продукта;  $m$  — масса (объем) навески продукта (смыва), взятая для приготовления исходного разведения, г или мл;  $V$  — объем жидкости, взятый для приготовления исходного разведения навески продукта (смыва), г или мл.

Количество микроорганизмов на 1 см<sup>2</sup> поверхности продукта определяют по формуле

$$X_1 = a \cdot 10^n \frac{V}{SV_1},$$

где  $S$  — общая площадь анализируемой поверхности в см<sup>2</sup>;  $V_1$  — объем посевной дозы (инокулята), внесенной в чашку Петри, мл.

Результаты вычисления количества микроорганизмов в 1 г продукта (в 1 мл смыва с продукта смывной жидкостью или на 1 см<sup>2</sup> поверхности продукта при смы-

ве тампоном) выражают числом колониеобразующих единиц (КОЕ) умноженным на  $10^n$ .

При показателе МАФАНМ более  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/г и при **отсутствии** признаков органолептической порчи перечисленные выше продукты не подлежат хранению в охлажденном состоянии. Их срочно отправляют на изготовление термически обработанных продуктов или на заморозку. Реализация их в охлажденном состоянии возможна в течение 4–6 ч.

Партию продукта с показателем МАФАНМ более  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/г и **признаками** органолептической порчи направляют на утилизацию.

В соответствии с Санитарными правилами и нормами количество МАФАНМ в 1 г охлажденного и замороженного мяса птицы не должно превышать 100 000 КОЕ/г.

### **Индикация БГКП**

Индикация и определение количества бактерий группы кишечных палочек в мясе птицы основаны на высеве определенного количества продукта в жидкие лактозосодержащие среды (среду Кесслера), выращивание посевов при  $37^\circ\text{C}$  в течение 48 ч, подтверждении принадлежности выросших микроорганизмов по сбраживанию лактозы с образованием кислоты и газа и морфологическим признакам к бактериям группы кишечных палочек.

Заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к БГКП, дают на основании выявления в посевах грамотрицательных, не образующих спор палочек, сбраживающих лактозу до кислоты и газа при температуре  $37^\circ\text{C}$ , указывая навеску продукта (в г), объем (в мл) или площадь смыва (в см).

### **Индикация сальмонелл**

Индикация сальмонелл в мясе птицы основана на высеивании определенного количества продукта (или смывов с его поверхности) на жидкие селективные питательные

среды с выделением чистых культур на дифференциально-диагностических средах, изучении морфологических, культуральных, биохимических признаков сальмонелл, с дальнейшей их серологической типизацией (идентификацией).

**Методика.** Берут навеску продукта 25 г (или смыв не менее 25 см<sup>2</sup>) и высевают в пептонно-буферную воду в соотношении 1:5. Просевы инкубируют 24 ч при температуре 37°C. Затем 10 мл культуральной жидкости из пептонно-буферной воды пересевают в 90 мл одной из сред обогащения (Мюллера, Кауфмана, селенитовую, магниевую) и инкубируют в термостате при 37°C. Через 24 и 48 ч из среды обогащения делают пересев на две любые дифференциальные среды (Эндо, Левина, ВСА и др.) по выбору и инкубируют в термостате 24 ч, а, если это ВСА, то — 48 ч.

При отсутствии подозрительных колоний на дифференциальных средах работу с посевами прекращают. Подозрительные колонии используют в дальнейших исследованиях, для этого отбирают не менее пяти типичных колоний. Изучают морфологические, тинкториальные, культуральные и ферментативные свойства: определяют способность расщеплять лактозу, глюкозу, сахарозу, манит, мочевины; образование сероводорода и индола, ацетилметилкарбинола (реакция Фогеса — Проскауэра), утилизацию цитрата. К бактериям рода сальмонелла **относят** культуры, не ферментирующие лактозу, сахарозу, расщепляющие глюкозу и маннит, образующие сероводород и не образующие индол, утилизирующие цитрат и не расщепляющие мочевины.

При обнаружении сальмонелл в партиях тушек птицы, в партиях бескостного кускового мяса вся партия должна быть направлена на изготовление консервов в соответствии с Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарной экспертизы мяса и мясных продуктов.

Результаты исследований записывают следующим образом: сальмонеллы обнаружены или не обнаружены в 25 г продукта (или в смыве продукта с указанием исследуемой площади в см<sup>2</sup>).

### Индикация золотистого стафилококка

Индикация стафилококка в мясе птицы основана на высеве навески мяса (смывов с его поверхности или их разведений) на элективные питательные среды с повышенным содержанием натрия хлорида или добавлением лития хлорида и принадлежности выросших микроорганизмов к *Staph. aureus* по морфологическим, культурально-ферментативным свойствам и коагуляции плазмы крови кролика.

Для выявления стафилококка в мясе птицы 1 г продукта измельчают, готовят исходное и ряд десятикратных разведений до 1:10–1:100. Из всех разведений делают посев по 1 мл в солевой бульон в соотношении к питательной среде 1:9. При выделении стафилококка из 1 г продукта используют 10 мл его первого разведения. При появлении роста в солевой среде делают посев на поверхность агара Байрда — Паркера, яично-желточно-солевой или яично-желточный азидный агар. Посевы на агаризированных средах просматривают после 18–24 ч инкубирования при температуре 37°C. На среде Байрда — Паркера стафилококки растут в виде черных блестящих выпуклых колоний диаметром 1–2 мм, окруженных зоной лецитиназной активности в виде кольца шириной 1–3 мм. На яично-желточном солевом и азидном агарах стафилококки растут в виде колоний желтого цвета, окруженных зоной лецитиназной активности.

Для подтверждения принадлежности обнаруженных микроорганизмов к стафилококкам изучают морфологические, тинкториальные свойства не менее чем из пяти колоний. Устанавливают способность ее коагулировать плазму крови кролика.

При обнаружении стафилококков дают заключение о наличии *Staph. aureus* в исследуемой пробе продукта с указанием массы навески (в г), площади (в см<sup>2</sup>) или смыва (в 1 мл).

При проведении бактериологического анализа на выявление в пробах стафилококков следует обратить внимание на возможное присутствие в них стрептококков,

которые на МПА образуют мелкие круглые плоские колонии, вначале прозрачные, затем мутнеющие.

В таблице 13 представлены микробиологические показатели мяса и мясопродуктов из птицы.

Таблица 13

### Микробиологические показатели мяса птицы

Группа продуктов	МАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			
		БГКП	СРК	<i>S. aureus</i>	патогенные МО, в том числе сальмонеллы
Птица охлажденная, замороженная	$1 \cdot 10^5$	—	—	—	—
Мясо птицы бескостное, кусковое, окорочка	$2 \cdot 10^5$	—	—	—	25
Потроха (печень, мышечные желудки, сердце)	$1 \cdot 10^5$	—	—	—	25

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Приготовить препарат-отпечаток из исследуемого мяса кур, окрасить по Граму, изучить под иммерсионным объективом, оценить качество мяса.

2. Сделать посев исследуемого куриного мяса в МПА, на агар Эндо, Левина и Плоскирева в чашках Петри.

3. На следующем занятии изучить культуральные свойства колоний, появившихся после посева. Обратить внимание на колонии, похожие по культуральным свойствам на возбудителей сальмонеллеза, возбудителей кокковых инфекций.

4. На следующем занятии провести идентификацию колоний, типичных для бактерий рода Сальмонелла, путем постановки РА на предметном стекле с поливалентными, Н- и О-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Перечислите правила отбора мяса кур для исследования.
2. В чем заключается метод вырезания кусочков мышц при исследовании мяса кур?
3. В чем заключается суть методики определения количества МАФАНМ в мясе кур?
4. На чем основана методика индикация БГКП в мясе кур?
5. На чем основана методика индикации сальмонелл в мясе кур?

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ КОНСЕРВОВ**

**Цель занятия.** Овладеть методами бактериологического контроля технологического процесса производства мясных консервов.

**Материалы и оборудование.** Образцы исследуемых консервных банок, консервный нож для открывания банок. Питательные среды: горячий МПА, среда Вильсона — Блера в пробирках высоким столбиком, чашки Петри с агаром Эндо, Левина, Плоскирева, Смирнова. Стерильный физраствор в колбах по 300 мл и пробирках по 9 мл, мензурки, стерильные пипетки на 1 мл, 10 мл, среды обогащения для сальмонелл. Ступки с пестиком, ножницы, скальпели, пинцеты, спирт для обжигания, спиртовки, бактериологические петли. Чашки Петри со стеклянной пластинкой 6×6 см, положенной на спички так, чтобы образовался зазор для питательной среды, для посева по Перетцу, пустые стерильные пробирки.

*Консервы* — пищевые продукты, предназначенные для длительного хранения, специально обработанные и герметично упакованные в тару, которая защищает их от проникновения микроорганизмов во время хранения и транспортировки.

Основным сырьем для выработки мясных баночных консервов служит мясо животных и субпродукты, которые всегда в той или иной степени обсеменены различными сапрофитными микробами, в том числе возбудителями порчи консервов (анаэробными клостридиями и термофильными бациллами), а иногда и токсигенными и патогенными микроорганизмами (токсигенные стафилококки, сальмонеллы и др.). Для выработки мясных консервов можно использовать мясо и субпродукты только от здоровых и упитанных животных. Нельзя применять сырье плохо обескровленное, загрязненное, дважды замороженное, условно годное. Степень обсеменения подготавливаемого сырья микроорганизмами находится в прямой зависимости от санитарно-гигиенических условий производства. При этом источниками обсеменения могут быть руки рабочих или оборудование, а также вспомогательные материалы (пряности, соль, сахар, жир-сырец), которые всегда содержат микроорганизмы.

Стерилизация консервов — заключительный этап технологического процесса консервирования. Под стерилизацией подразумевается различная степень нагревания продукта, приводящая к получению микробиологически стабильного консервированного продукта, не содержащего микроорганизмы, способные развиваться в нем при хранении в определенных температурных режимах. Основная цель стерилизации консервов — уничтожение патогенных и токсигенных микроорганизмов, способных вызывать порчу продукта. Режим стерилизации устанавливают в зависимости от вида консервов, для мясных консервов это 112–120°C. Однако, несмотря на воздействие высоких температур, в консервах могут сохраняться жизнеспособные микробные клетки, т. е. не всегда достигается полная стерилизация всех банок.

Эффективность стерилизации консервов зависит не только от продолжительности и температуры нагревания, но и количественного состава микрофлоры, pH среды, содержания в нем жира и поваренной соли.

Споры различных видов спорообразующих микроорганизмов обладают неодинаковой устойчивостью к высоким температурам. Так, споры многих мезофильных аэробных бацилл отмирают уже при 100°C, тогда как споры *Bac. subtilis* могут сохранять жизнеспособность при 130°C. Клостридии анаэробных микроорганизмов отмирают при высоких температурах медленнее, чем споры аэробов.

В большой степени на результаты стерилизации влияет и количественный состав микрофлоры, чем **выше** начальная микробная обсемененность консервов, тем больше времени требуется для полного уничтожения микроорганизмов и тем больше их может выжить при нагревании. Кислая среда ускоряет коагуляцию белков и отмирание микроорганизмов, а также вызывает снижение термоустойчивости вегетативных клеток и их спор.

Микроорганизмы, которые в процессе стерилизации консервов, сохранили свою жизнеспособность, принято называть остаточной микрофлорой. Состав остаточной микрофлоры стерилизованных консервов, как правило, представлен спорowymi микроорганизмами. Наличие в готовых консервах жизнеспособных клеток бесспорных бактерий всегда указывает на нарушение температурного режима, в результате которого стерилизация оказалась недостаточной. В таких случаях кроме спорообразующих микробов, в консервах обнаруживают стафилококки, кишечную палочку и протей.

В соответствии с положением о порядке санитарно-технического контроля на производственных предприятиях в розничной торговле и на предприятиях общественного питания все консервы в зависимости от состава сырья, термической обработки и величины pH подразделяют на шесть групп:

- группа А — полные консервы: консервы из говядины, свинины, конины, мяса птицы с растительными наполнителями или без них, простерилизованные в автоклавах при 110–120°C, со сроком хранения от 9 мес. до 2 лет при температуре не выше 30°C;

- группа Д — полуконсервы (ветчина, бекон, сосиски) стерилизованные при 100–110°C. Их безопасность и сохранность гарантируются при хранении при температуре от 2 до 15°C;
- группы Б, В, Г, Е — растительные консервы (овощи, фрукты, плодово-ягодные компоты, соки).

Особая группа консервов — пресервы. Это пастеризованные консервы, которые производят из говядины, свинины, мяса птицы, рыбы и подвергают тепловой обработке при температуре не выше 100°C, а в случае асептического консервирования — при 130°C. Сохранность таких консервов гарантируется хранением при температуре не выше 5°C.

## 17.1. ОТБОР ПРОБ

Для контроля качества консервов вместимостью до 1 л включительно от партии отбираются три единицы потребительской тары и одна единица, если вместимость больше 1 л. Образцы консервных банок направляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывается дата, показатели, которые должны быть определены, размеры партии, от которой отобран средний образец, сорт и дата выработки продукта, должность и фамилия лиц, отобравших образец.

Доставленные образцы осматривают и проверяют герметичность по следующей методике. Банки освобождают от этикеток, помещают в один ряд в предварительно нагретую до кипения воду, воду берут в четырехкратном количестве по отношению к массе банок. Слой воды над банками должен быть не менее 3 см. Появление струйки пузырьков указывает на негерметичность корпуса банки. Банки выдерживают не менее 5–7 мин, сначала на дне, потом переворачивают на крышку. Для бактериологического исследования используют только герметичные банки.

В зависимости от явных и скрытых дефектов различают физический, химический и микробиологический брак. Дефектами внешнего вида тары с фасованной в нее продукцией считают видимые невооруженным глазом признаки негерметичности — пробоины, подтеки или следы продукта, вытекающего из банки, а также бомбаж — вздутие консервной банки. К дефектам консервированного продукта относятся видимые невооруженным глазом признаки развития микроорганизмов, такие как брожение, заплесневение.

Перед микробиологическим анализом банки подвергают термостатированию, но только герметично укупоренные, бездефектные по внешнему виду, предназначенные для определения промышленной стерильности. Консервы, предназначенные для выявления ботулинических токсинов, бомбажные, с признаками микробиологической порчи и негерметичные, термостатированию не подлежат.

Для проявления жизнедеятельности МАФАНМ консервы помещают в термостат при 30–37°C в таре до 1 л включительно не менее 5 сут, а свыше 1 л — не менее 7 сут. Для выявления термофильных микроорганизмов банки в любой таре выдерживают в термостате не менее 3 сут. Ежедневно консервы осматривают. При появлении дефектов банки удаляют из термостата, выдерживают при комнатной температуре 24 ч, и если консервы принимают прежний вид, то их считают бездефектными и продолжают термостатирование. По истечении времени инкубирования консервы извлекают из термостата и оставляют при комнатной температуре на сутки. Отмечают дефекты тары, видимые невооруженным глазом, признаки брожения, плесневения самого продукта в стеклянных банках, в металлической таре — явления бомбажа.

**Подготовка к микробиологическому исследованию.** Банки тщательно моют теплой водой и вытирают. Затем крышку банки протирают смоченным в спирте тампоном, фламбируют и вскрывают консервным ножом со строгим соблюдением всех правил асептики. Проводят

органолептическое исследование: определяют внешний вид, цвет, запах и состояние содержимого. Органолептические признаки специфичны для каждого вида консервов, они должны отвечать требованиям стандартов и технических условий.

Из каждой консервной банки отбирают одну или несколько навесок, предназначенных для непосредственного высева, приготовления последовательных разведений для проведения всех видов исследования. Навеску для посева отбирают *весовым* или *объемным* методом после вскрытия банки консервов **в условиях, исключающих микробное загрязнение**, в образце должны быть представлены все компоненты и в том же соотношении, что и в продукте.

### **Индикация и определение БГКП**

Они предусматривают установление наличия БГКП в определенной навеске продукта и подсчет их количества. По микробиологическим нормативам не допускается наличие бактерий группы кишечной палочки в 1 г консервированного мяса.

**Методика.** Для индикации БГКП проводят посев по 1 г натурального продукта и из разведений 1:10, 1:100 в среду Кесслера. Посевы культивируют 24 ч в термостате при 37°C, предварительный учет проводят через 24 ч, окончательный — через 48 ч. При отсутствии признаков роста делают заключение об отсутствии БГКП в исследуемом продукте.

При появлении роста, признаками которого являются помутнение среды, образование газа, изменение цвета среды, проводят дальнейшие исследования. Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к бактериям группы кишечной палочки из проросших пробирок делают высев 0,1 мл культуральной жидкости на одну из дифференциально-диагностических сред — агар Эндо или агар Смирнова (характерно появление желтых колоний). Посевы инкубируют в термостате при

37°C в течение 24 ч. Из изолированных колоний по своим культуральным признакам характерным для кишечной палочки, делают препараты, окрашивают по Граму, изучают морфологические признаки.

В некоторых случаях можно проводить первичный посев 0,1 мл исходного продукта или из десятикратного разведения непосредственно на поверхность дифференциально-диагностических сред (Эндо), что позволит дать заключение о наличии (или отсутствии) БГКП в определенной навеске продукта уже через 24 ч. Не менее чем в пяти колониях изучают морфологию микроорганизмов в мазках, окрашенных по Граму.

Обнаружение коротких с закругленными концами грамотрицательных палочек, специфически изменяющих цвет жидких дифференциально-диагностических сред и образующих характерные колонии на селективных средах с лактозой, указывает на наличие БГКП.

В заключении указывают, обнаружены или отсутствуют БГКП в 1 г исследуемого продукта.

### **Индикация сальмонелл**

В связи с тем, что они присутствуют в консервах в небольшом количестве, она проводится в четыре этапа:

- предварительное обогащение — выдерживание пробы в термостате в жидкой неселективной среде (буферная, пептонная вода, МПВ) при 37°C;
- обогащение — посев предварительно обогащенной среды в две жидкие селективные среды (селенитовый бульон, тетраэтилатная среда) с последующим выдерживанием в термостате соответственно при 37 или 42°C в течение 24–48 ч (в этих средах происходит накопление энтеробактерий и подавление сопутствующей микрофлоры);
- пересев с двух обогащенных сред на плотные селективно-диагностические среды в чашках Петри (БФ-агар, среда Эндо), которые после выдерживания в термостате при 37°C исследуют на наличие

колоний, по своим характеристикам подозрительных на сальмонеллы;

- идентификация — пересев подозрительных на сальмонеллы колоний и определение культурально-биохимических и антигенных свойств выделенных микроорганизмов.

**Методика.** Для проведения исследования измельчают навеску продукта массой 25 г с соблюдением правил асептики. Затем измельченную навеску гомогенизируют в 225 мл буферной пептонной воды (получается разведение 1:10), помещают в термостат при 37°C на 16–20 ч. После этого по 10 мл пептонной воды пересевают в две колбы со 100 мл среды (в первой колбе тетраэтионатная среда, во второй — селенитовая). Колбы помещают в термостат: первую при 42°C, а вторую — при 37°C.

Через сутки бактериологической петлей проводят пересев на БФ-агар и висмут-сульфитный агар (чаще используют агар Эндо), чтобы получить изолированные колонии. Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, определяют подвижность в препарате «висячая» или «раздавленная капля».

Далее изучают ферментативную активность, антигенную структуру, устанавливают род и вид сальмонелл. В заключении указывают, обнаружены или отсутствуют сальмонеллы в 25 г исследуемого продукта.

### **Индикация сульфитредуцирующих клостридий (СРК)**

Она основана на высеве навески (или его разведений) либо культуральной жидкости в железосульфитсодержащие среды и подтверждении принадлежности выросших при 37°C в течение 72 ч микроорганизмов к СРК по морфологическим и культурально-биохимическим признакам. Наличие СРК в соответствии с Санитарными правилами и нормами не допускается в 0,1 г консервированного продукта.

Исследование проводят для анализа микрофлоры посевов (культуральной жидкости), в которых при опре-

делении промышленной стерильности обнаружены мезофильные клостридии, и необходимо подтверждение присутствия в посевах *Cl. perfringens*.

**Методика.** По 1 г подготовленной пробы продукта (или его разведения) вносят параллельно в две чашки Петри и заливают расплавленной и охлажденной до 45°C средой Вильсона — Блера (или сульфит-полимиксин-неомициновый агар), равномерно перемешивают с посевным материалом, а после застывания заливают слоем голодного агара. Чашки выдерживают в анаэробных условиях при 37°C в течение 24 ч. Посевы просматривают, отбирают те чашки, в которых выросло от 15 до 150 характерных черных колоний, подсчитывают их количество.

Для подтверждения принадлежности обнаруженных колоний к *Cl. perfringens* отбирают не менее пяти с характерными признаками и пересевают их в МППБ для мезофильных анаэробных микроорганизмов. Посевы культивируют в термостате 24 ч при 37°C и изучают морфологические и биохимические свойства культуры.

*Cl. perfringens* — крупные грамположительные палочки, расположенные одиночно или в виде коротких цепочек. Споры овальные, расположенные субтерминально. Каталазу не образуют, ферментируют лактозу, разжижают МПЖ, в лакмусовом молоке образуют губчатый сгусток красновато-сиреневого цвета. Для них характерен анаэробный рост.

### **Выявление ботулинического токсина в консервах**

**Методика.** Продукт измельчают, растирают в стерильной ступке до однородной консистенции, добавляя физраствор до соотношения 1:1. Полученную смесь экстрагируют в холодильнике в течение 2 ч. Затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр, полученный фильтрат переносят в две пробирки по 3 мл, в третью — 2,7 мл фильтрата, в который добавляют 0,3 мл раствора трипсина, устанавливают рН 6 и ставят в термостат на 1 ч, периодически перемешивая.

Содержимое первой пробирки оставляют без обработки, а второй — кипятят в водяной бане 10 мин для разрушения ботулинического токсина и охлаждают до комнатной температуры.

Биопробу ставят на белых мышах массой 15–20 г, которым вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл исследуемых фильтратов. Наблюдение за животными проводят через 1, 2, 4, 12 ч, далее — 2 раза в день в течение 3 сут. Клинические симптомы ботулинической интоксикации появляются через 10–12 ч, токсином типа Е — через 2–4 ч. При этом у мышей шерсть взъерошена, дыхание затруднено, мышцы брюшной стенки ослаблены и западают («осиная талия»), наблюдаются судороги, паралич задних конечностей. Гибель животных наступает через 4–6 ч, а при высоких концентрациях токсина — в течение 1–2 ч без характерных признаков, в этих случаях биопробу повторяют с разведением исходной жидкости 1:10–1:100.

При наличии в материале ботулинических токсинов вначале болеют и погибают те животные, которым введена необработанная исходная жидкость или обработанная протеолитическим ферментом. Мыши после инъекции прокипяченной жидкости остаются здоровыми на протяжении всего опыта.

### **Индикация и определение количества золотистого стафилококка**

Для этого делают посев исследуемых консервов с использованием селективно-диагностических сред по схеме:

- 1) высеив навески;
- 2) подсчет колоний с характерными для стафилококка признаками;
- 3) идентификацию выделенных культур.

Если в посевах обнаружены грамположительные кокки, способные коагулировать плазму крови, образующие каталазу, ферментирующие мальтозу в анаэробных

условиях, то выявленные микроорганизмы относят к *Staph. aureus*.

При определении потенциальной энтеротоксичности выделенных культур *Staph. aureus* устанавливают их способность образовывать термостабильную нуклеазу по следующей методике:

- готовят суточную культуру изучаемого стафилококка в МПБ и прогревают ее 15 мин в кипящей бане;
- готовят чашки Петри с МПА, содержащим ДНК, асептически вырезают «колодцы» диаметром 4 мм, на расстоянии 7–8 мм друг от друга;
- в эти колодцы вносят по две капли прогретой бульонной культуры *S. aureus*;
- чашки ставят в термостат, результаты учитывают через 1, 2 и 5 ч. При наличии термостабильной нуклеазы вокруг «колодцев» появляется яркорозовая зона на синем фоне среды.

Микробиологические показатели консервов в соответствии с Санитарными правилами и нормами представлены в таблице 14.

Таблица 14

**Микробиологические нормативы мясных консервов**

Консервы	МАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			
		БГКП	СРК	S. aureus	патоген- ные МО, в том числе сальмо- неллы
Пастеризованные из говядины и свинины	$2 \cdot 10^2$	1	0,1	1	25
Стерилизованные из говядины и свинины	Должны удовлетворять требованиям промышленной стерильности для консервов группы А				

## Стерильность консервов

Стерильность консервов определяют в случаях, когда они выработаны по специальным заказам и для поставок экспедициям, космонавтике и лечебным учреждениям.

При определении стерильности консервов 1 мл (г) исходного продукта без разведения вносят в чашку Петри, заливают расплавленным и охлажденным до 50°C МПА, тщательно перемешивают содержимое чашки, охлаждают и ставят в термостат при 37°C. Через 72 ч подсчитывают количество выросших колоний и определяют количество микроорганизмов в 1 см<sup>3</sup> или в 1 г продукта.

**Определение промышленной стерильности.** При определении промышленной стерильности в каждой упаковочной единице устанавливают присутствие или отсутствие тех микроорганизмов, показатели которых оговариваются в нормативном документе.

Поэтому при выработке различных видов консервов ориентируются обычно на консервированный продукт, соответствующий требованиям промышленной стерильности. В консервированном продукте *промышленной стерильности* допускается присутствие только ограниченного числа видов спорообразующих микроорганизмов. В нем должны отсутствовать микроорганизмы и токсины микробного происхождения, опасные для здоровья людей, а также микроорганизмы, способные развиваться и вызывать порчу продукта при температуре хранения, установленной для данного вида консервов.

Из пробы консервированного продукта, подготовленного для анализа, готовят исходное и ряд десятикратных разведений на физрастворе, обычно готовят разведения до 10<sup>4</sup>. Из каждого разведения по 1 мл вносят параллельно в две чашки Петри, заливают горячим, охлажденным до 50°C МПА, термостатируют 24 ч при 37°C, подсчитывают количество колоний. Расчет ведут по формуле

$$X = \frac{a \cdot 10^n (V_{\text{пр}} + V_{\text{вод}})}{V_{\text{пр}} \cdot q},$$

где  $a$  — количество колоний в чашке Петри;  $n$  — степень разведения продукта при приготовлении разведений;  $V_{\text{вод}}$  — объем воды, использованный для приготовления пробы;  $V_{\text{пр}}$  — объем продукта, использованного для приготовления пробы;  $q$  — объем посевного материала, внесенного в чашку Петри.

Из параллельных посевов определяют среднее арифметическое число колоний на чашках, умножают его на соответствующее разведение и находят количество микроорганизмов в 1 г продукта по формуле. После подсчета колоний определяют родовую и видовую принадлежность выделенного микроорганизма.

В нормативном документе на промышленно-стерильные консервы регламентированы видовой состав и допустимое количество микроорганизмов, а также внешний вид, результаты микроскопии и значение pH. Если хотя бы в одном из посевов обнаружены мезофильные клостридии *Cl. botulinum* и (или) *Cl. perfringens*, консервы оценивают как **не отвечающие** требованиям промышленной стерильности.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Провести вскрытие консервной банки с соблюдением правил асептики, взять пробу для бактериологического исследования.
2. Сделать посев пробы для определения МАФАНМ в 1 г консервов.
3. Сделать посев пробы исследуемых консервов в МППБ и среды Вильсон — Блера для индикации анаэробных бактерий.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие пищевые продукты отнесены к консервам?
2. На какие группы подразделяются консервы?
3. Требования, предъявляемые к промышленной стерильности.
4. В чем суть индикации кишечной палочки в консервах?
5. В чем суть индикации сальмонелл в консервах?
6. В чем суть индикации сульфитредуцирующих клостридий в консервах?

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ**

**Цель занятия.** Овладеть методами бактериологического контроля технологического процесса производства вареных и копченых видов колбас.

**Материалы и оборудование.** Образцы вареных и копченых видов колбас. Стерильные чашки Петри, скальпели, ножницы, пинцеты, весы с разновесками, ступки с пестиком, стерильный песок. Чашки Петри с питательными средами — агаром Эндо, Левина, Плоскирева, пробирки со средой Крумвиде — Олькеницкого. Стерильный физраствор в колбах по 90 мл, в пробирках по 9 мл, стерильные пипетки на 1, 10 мл, стерильные мензурки.

*Колбасные изделия* — продукты переработки мяса, которые употребляют в пищу без дополнительной подготовки, так как мясо, используемое для приготовления, подвергают специальной механической, физико-химической и термической обработке. К этим изделиям относятся вареные, полукопченые, варено-копченые, сырокопченые, ливерные и кровяные колбасы, мясные хлебцы, сосиски, сардельки, студни.

Колбасные изделия представляют собой благоприятную среду для развития различных микроорганизмов, вызывающих микробную порчу: термофильных молочнокислых бактерий (закисание), плесневых грибов и протеолитических бацилл (гниение). Быстро портятся варено-копченые и вареные колбасные изделия влажностью более 40–50%, особенно при нарушениях температурно-влажностного режима хранения. В меньшей степени подвержены порче сырокопченые изделия из-за низкого содержания влаги (20–30%).

Степень исходной микробной обсемененности колбасного фарша зависит от санитарно-гигиенических условий производства и соблюдения технологических режимов. В процессе приготовления колбасных изделий мясной фарш обсеменяется различными микроорганизмами, попадающими в него из вспомогательных материалов: молочные, яичные, мучные продукты, белковые стабилизаторы, посолочные смеси (соль, сахар, нитраты), пряности, лук, чеснок и другие компоненты.

Бактериологическое исследование колбасных изделий направлено на определение количества МАФАНМ, БГКП, индикацию сальмонелл, бактерии родов *Proteus*, микроорганизмов порчи — в основном это дрожжи и плесневые грибы.

## 18.1. ОТБОР, ПОДГОТОВКА ПРОБ И ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пробы продуктов для микробиологического исследования отбирают раньше проб для физико-химического и органолептического исследования с соблюдением правил асептики, в стерильную посуду, с применением стерильных инструментов. Масса пробы установлена НТД на конкретный вид продукции, достаточной для проведения полного микробиологического анализа.

От кусковой продукции массой нетто до 1000 г отбирают точечные пробы ложкой, пинцетом или другими

инструментами, помещают в посуду или упаковывают в фольгу. Пробы скоропортящихся продуктов транспортируют при температуре 5°C не более 6 ч.

От кусковой продукции массой нетто более 1000 г пробы отбирают одним из следующих методов:

- отрезают или вырезают часть продукта ножом или пилой. У изделий квадратной формы разрез делают перпендикулярно к грани, продольной формы — перпендикулярно к продольной оси;
- продукт в нескольких местах режут ножом и с поверхности разреза и из глубины продукта скальпелем берут необходимое количество кусков, которые пинцетом переносят в стерильную посуду;
- срезают поверхностный слой продукта толщиной от 0,5 до 1 см ножом, при помощи буравчика или зонда и выдавливают продукт в посуду. При отборе пробы из глубины продукта его просверливают в разных местах не менее чем до половины высоты.

Каждую отобранную пробу маркируют этикетками с указанием наименования продукта, предприятия-изготовителя, номера партии, даты отбора продукта, цели микробиологического анализа, подписи лиц, отбравших пробу. Пробы, предназначенные для исследования вне предприятия, пломбируют, опечатывают и транспортируют в лабораторию.

В зависимости от вида продукта объединенную пробу массой 50 г составляют из точечных проб следующим методом.

Колбасные изделия в оболочке, продукты из говядины, свинины, баранины помещают в эмалированный поддон, тщательно протирают спиртовым тампоном и дважды обжигают над пламенем спиртовки. Затем батоны разрезают продольно стерильным ножом на две половины, не рассекая оболочку противоположной стороны батона. Пробу отбирают из нескольких участков центральной части батона и из-под оболочки обеих его половинок.

Изделия без оболочки (мясные хлебцы, студни и др.) исследуют с поверхности и в глубине. Для этого после разворачивания упаковки с каждого из исследуемых образцов делают смыв новым стерильным увлажненным ватным тампоном с тех участков продукта, с которыми могли соприкоснуться руки упаковщика. Тампоны помещают в пробирки, заполненные на  $3/4$  одной из сред: ХБ, Хейфеца или Кесслера. Для анализа глубинных участков образцы изделий без оболочки помещают на стерильный эмалированный поддон, смачивают спиртом и обжигают. Делают продольный разрез и отбирают навеску методом, указанным для колбасных изделий в оболочке. Составляют одну объединенную пробу для каждого образца в отдельности и помещают ее в предварительно взвешенную стерильную чашку Петри.

Из объединенной пробы каждого образца берут в стерильную посуду (или пергаментную бумагу) навеску массой 10 г, которую помещают в стерильный стакан гомогенизатора, добавляют 90 мл стерильного физраствора и гомогенизируют в электрическом смесителе (можно магнитной мешалке). Вначале материал измельчают на кусочки при замедленной частоте вращения ножей, затем — при 15 000–20 000 об/мин в течение 2–3 мин.

При отсутствии гомогенизатора допускается приготовление исследуемой взвеси в ступке. 10 г продукта растирают в стерильной фарфоровой ступке с 2–3 г речного песка, постепенно приливая 90 мл стерильного физраствора. Таким образом в 1 мл приготовленной взвеси будет содержаться 0,1 г натурального продукта. Из нее 1 мл переносят в пробирку с 9 мл физраствора и готовят разведение 1:100, в 1 мл которого будет 0,01 г продукта.

Взвесь 15 мин выдерживают при комнатной температуре и делают высев для определения количества МАФАНМ, БГКП, бактерий рода сальмонелла и протей, сульфитредуцирующих клостридий.

### Методика определения МАФАНМ

Из каждой пробы делают не менее двух различных по объему посевов, взятых с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. В одну чашку Петри надо внести 0,1 г, а в другую — 0,01 г натурального продукта.

Для этого из приготовленных разведений 1:10 и 1:100 вносят по 1 мл в чашки Петри и по обычной методике заливают расплавленным агаром, перемешивают для равномерного распределения материала, чтобы выросли изолированные колонии, охлаждают и ставят в термостат при 37°C на 48 ч. Подсчитывают общее количество колоний, выросших на поверхности и в глубине агара, умножают на степень разведения исследуемого продукта и определяют количество бактерий в 1 г натурального продукта (сравнивают с нормативами).

### Методика индикации БГКП

Цель индикации бактерий этой группы — проверка соблюдения режима термической обработки колбас или санитарно-гигиенических условий в процессе производства сырокопченых колбасных изделий. Исследование на БГКП проводят по общепринятой методике с использованием сред, содержащих углеводы (лактоза, глюкоза). К ним относятся среды Хейфеца, ХБ, Кода, Кесслера. БГКП ферментируют глюкозу и лактозу, поэтому в перечисленных средах образуются кислые продукты, меняющие цвет индикатора, а в среде Кесслера можно наблюдать появление в поплавках пузырьков газа.

При микробиологическом контроле колбасных изделий в производственных лабораториях можно ограничиться обнаружением БГКП без их биохимической дифференциации. Для выявления БГКП в пробирки с 5 мл среды ХБ или Хейфеца двойной концентрации вносят по 5 мл исследуемой взвеси стерильной пипеткой с широким концом. Допускается применение среды Кесслера

по 10 мл. Посевы термостатируют при 37°C в течение 18–20 ч. Посевы смывов, отобранных тампонами с поверхности изделий без оболочки, выдерживают при температуре 43°C (для обнаружения повторного бактериального загрязнения). При росте БГКП среда ХБ окрашивается в желтый цвет, среда Хейфеца — в салатно-зеленый, на среде Кесслера — в поплавах образуется газ.

Для окончательного заключения о присутствии в продукте БГКП проводят высев со среды Кесслера (из забродивших проб) или Хейфеца (если произошло изменение цвета среды) в чашки Петри со средой Эндо (Плоскирева, Левина) и помещают в термостат при 37°C на 18–20 ч. На среде Эндо БГКП образуют темно-красные колонии с металлическим блеском, на среде Плоскирева — кирпично-красные, на среде Левина — темно-фиолетовые колонии. Из подозреваемых колоний готовят мазки, окрашивают по Граму — обнаруживают грамотрицательные палочки.

Обнаружение коротких с закругленными концами грамотрицательных палочек, специфически изменяющих цвет жидких дифференциально-диагностических сред и образующих характерные колонии на элективных средах с лактозой, указывает на наличие БГКП.

### **Индикация сальмонелл**

Навеску продукта массой 25 г от объединенной пробы, тщательно измельченной ножницами, вносят во флакон, содержащий 100 мл среды обогащения (Мюллера, Кауфмана, хлористо-магниевой) или 225 мл селенитового бульона. Флакон встряхивают и ставят в термостат при 37°C на 24 ч. Затем петлей или пастеровской пипеткой проводят высев из среды обогащения в чашки Петри со средой Эндо, Плоскирева, Левина или ВСА. Посевы помещают в термостат при 37°C на 16–24 ч.

На среде Эндо, Плоскирева и Левина бактерии из рода сальмонелл образуют бесцветные колонии. На ВСА сальмонеллы образуют черные или коричневые колонии

с металлическим блеском, при этом участок среды под агаром чернеет. Не менее пяти изолированных колоний, характерных для сальмонелл, пересевают на трехсахарный агар Крумвиде — Олькеницкого в модификации Ковальчука штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик и инкубируют при 37°C в течение 12–16 ч.

При росте сальмонелл на трехсахарном агаре цвет скошенной поверхности среды розовый, столбик желто-бурый. Газообразование устанавливают по наличию трещин и разрыву столбика агара, при образовании сероводорода питательная среда чернеет.

Другие грамотрицательные бактерии семейства энтеробактерий дают следующие изменения цвета трехсахарного агара:

- БГКП на трехсахарном агаре вызывают окрашивание среды в синий или сине-зеленый цвет с образованием газа или без него;
- палочка протей вызывает окрашивание среды в ярко-красный цвет (вследствие расщепления мочевины), в случае выделения  $H_2S$  может появиться черный осадок с возможным разрывом агара.

Для дальнейшей идентификации бактерий готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют, а также изучают антигенные свойства путем постановки РА на предметном стекле с поливалентной (или комплексной) сальмонеллезной агглютинирующей сывороткой. Далее проводят идентификацию с помощью монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сальмонеллезных сывороток.

Обнаружение подвижных (кроме *S. pullorum* и *S. gallinarum*) грамотрицательных палочек, дающих характерный рост на элективных средах, не ферментирующих лактозу и сахарозу, сбрасывающих глюкозу и манит до кислоты и газа (*S. typhi-suis* манит неферментирует), образующих  $H_2S$  и не образующих индол, дающих положительную реакцию агглютинации с комплексными, монорецепторными О- и Н-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками, указывает на выделение бактерий из рода сальмонелл.

### **Индикация протeya**

Она проводится внесением исследуемого продукта в конденсат свежескошенного МПА (метод Щукевича). Посевы помещают в термостат на 18–24 ч при 37°C. При наличии в исследуемом продукте протeya подвижная палочка поднимается вверх по скошенной поверхности агара, образуя вуалеобразный голубоватый налет. Культура издает характерный гнилостный запах.

Обнаружение полиморфных грамотрицательных палочек, подвижных, сбраживающих глюкозу и мочевины, не ферментирующих лактозу и манит, указывает на наличие в продукте бактерий из рода *Протeya*.

### **Индикация стафилококка**

Она основана на изучении морфологии, культуральных свойств и способности некоторых стафилококков ферментировать лецитиназу и коагулировать цитратную плазму крови кролика под воздействием фермента коагулазы.

Вначале исследуемый продукт разводят 1:10, вносят в МПБ, содержащий 6,5% натрия хлорида. После инкубирования в термостате проводят пересев на молочно-солевой агар для изучения наличия пигмента и на желточно-солевой агар для выявления лецитиназной активности.

Посевы выдерживают 24 ч в термостате и сутки при комнатной температуре, затем учитывают результат: на поверхности питательной среды колонии стафилококка имеют вид слегка выпуклых круглых колоний с ровными краями; на желточно-солевом агаре колонии стафилококков могут образовывать радужный венчик, что является одним из признаков их патогенности (лецитиназная активность).

Не менее чем из 5 типичных колоний готовят препараты, которые окрашивают по Граму. При наличии стафилококков обнаруживают грамположительные кокки, располагающиеся в виде кучек и гроздьев винограда.

Для подтверждения патогенности выделенных стафилококков ставят реакцию плазмокоагуляции по методике: в пробирку с 0,5 мл цитратной плазмы крови кролика, разведенной физраствором (1:5), вносят петлю чистой суточной культуры стафилококка и ставят в термостат при 37°C. Реакцию плазмокоагуляции предварительно учитывают через 3–4 ч (осторожно, не встряхивая пробирку). В сомнительных случаях пробирку оставляют в термостате для окончательного учета через 24 ч. Реакцию считают положительной, если плазма коагулирует в сгусток (реакцию оценивают по степени плотности сгустка от одного до четырех плюсов).

### **Индикация сульфитредуцирующих клостридий (СРК)**

Она основана на учете специфического роста клостридий в железосульфитсодержащих средах. При взаимодействии натрия сульфита с хлоридом железа образуется сульфат железа, который вызывает почернение питательной среды.

Для выявления СРК 1 мл исследуемой взвеси стерильной пипеткой вносят в пробирку с 9 мл жидкой сульфитциклосериновой среды или среды Вильсона — Блера. Затем проводят последовательные пересевы на аналогичные объемы среды и получают возрастающие десятикратные разведения суспензии. Посевы выдерживают 18–20 ч при 37°C, при наличии СРК среда чернеет.

Для подтверждения принадлежности выделенных культур к клостридиям проводят пересев на поверхность агаризованной плотной среды Вильсон — Блера и инкубируют в анаэробных условиях при 37°C в течение 24–48 ч. Отбирают типичные колонии и изучают микроорганизмы по морфологическим и некоторым культурально-биохимическим свойствам, в частности по отрицательной реакции на каталазу.

Если в посевах (в 4 колониях из 5) обнаружены СРК, грамположительные палочки, нередко в виде спор, каталазоотрицательные, способные расти в анаэробных условиях, то делают заключение о наличии в продукте СРК по максимальному разведению суспензии, в посевах которого наблюдается почернение среды. Например, если характерные изменения наблюдаются в пробирках с разведением  $10^{-1}$ , то считают, что в 1 г исследуемого продукта содержится 10 клеток, при аналогичных изменениях в пробирках с разведением  $10^{-2}$  — 100 клеток.

При получении неудовлетворительных результатов микробиологического анализа готовой продукции по требованию контролирующих организаций проводят исследование вспомогательных материалов.

Микробиологические показатели колбасных изделий и продуктов из мяса, регламентированные СанПиН, представлены в таблице 15.

Таблица 15

**Микробиологические нормативы колбасных изделий  
и продуктов из мяса животных и птиц**

Группа продуктов	МАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается наличие			
		БГКП	СРК	S. aureus	патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл
Колбаса сырокопченая	—	0,1	0,01	1	25
Вареные колбасные изделия: высшего и первого сорта	$1 \cdot 10^3$	1	0,01	1	25
	$2,5 \cdot 10^3$	1	0,01	1	25

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести бактериологическое исследование вареной колбасы для определения количества МАФAnM.
2. Провести бактериологическое исследование вареной колбасы для определения наличия БГКП.
3. Провести бактериологическое исследование вареной колбасы для индикации сальмонелл.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Какие пищевые продукты отнесены колбасам?
2. Правила отбора и подготовки проб для исследования.
3. В чем суть индикации кишечной палочки в колбасных изделиях?
4. В чем суть индикации сальмонелл в колбасных изделиях?
5. В чем суть индикации сульфитредуцирующих клостридий в колбасных изделиях?

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ЯИЦ И ЯЙЦЕПРОДУКТОВ**

**Цель занятия.** Овладеть методами бактериологического контроля технологического процесса производства яиц и яйцепродуктов.

**Материалы и оборудование.** Куриные яйца, яичный порошок, 0,5%-ный раствор кальцинированной соды, 70%-ный спирт, стерильный физраствор в колбах, в пробирках по 9 мл, стерильные пипетки, стерильные марлевые тампоны 5×5 см в чашках Петри, стерильные ступки, чашки Петри, МПА столбиком в пробирках по 9 мл, Среды Кесслера, Кауфмана, среды обогащения, Крумвиде — Олькеницкого, Клиглера, стерильные мензурки.

Санитарно-микробиологическому контролю подвергаются поступающее сырье (яйца куриные), готовые продукты: яичный меланж, яичный порошок, а также контроль соблюдения технологических и санитарно-гигиенических режимов производства яйцепродуктов.

Яйца для микробиологического анализа отбирают из разных мест партии методом случайной выборки в количестве 30 штук (в некоторых случаях — не менее

5–10 яиц). Отобранную пробу упаковывают в чистую тару и транспортируют в условиях, исключающих их повреждение и вторичную контаминацию (загрязнение).

Особенность санитарно-микробиологического исследования яиц и продуктов их переработки заключается в одновременном исследовании микрофлоры на поверхности скорлупы и содержимом яйца.

## 19.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ СКОРЛУПЫ ЯИЦ

При микробиологическом исследовании поверхности скорлупы яиц делают смывы, полученные:

- 1) методом тампона;
- 2) методом ополаскивания;
- 3) методом измельчения.

При получении смыва *методом тампона* в ступку, содержащую 10 мл стерильного физраствора, погружают яйцо и с помощью стерильного тампона обмывают поверхность яйца в течение 2–3 мин, полученный смыв исследуют.

При получении смыва *методом ополаскивания* в стерильную посуду или полиэтиленовый пакет наливают 10 мл стерильной жидкости, в которую погружают яйцо и встряхивают 5 мин. Полученный смыв исследуют.

При получении смыва *методом измельчения* скорлупу и подскорлупную оболочку от трех яиц отделяют от содержимого и помещают в стерильные ступки. Содержимое растирают пестиком, заливают 90 мл стерильной жидкости. После 3–5 мин отстаивания надосадочную жидкость исследуют без разведения или готовят десятикратные разведения в зависимости от степени загрязнения поверхности скорлупы.

Математически поверхность яйца вычисляют по формуле

$$S = \pi \frac{bl}{2},$$

где  $S$  — площадь поверхности;  $b$  — ширина яйца, см;  $l$  — длина окружности, см;  $\pi = 3,14$ .

Общую бактериальную обсемененность поверхности яиц (т. е. количество МАФАНМ) определяют общепринятыми методами путем посева 1 мл смыва или его десятикратных разведений параллельно в две чашки Петри, которые заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА, культивируют при 30°C в термостате 48–72 ч. Подсчитывают все колонии, выросшие в глубине и на поверхности плотной питательной среды, определяют среднее арифметическое число колоний по двум чашкам одного разведения, умножают на величину разведения и делят на площадь поверхности скорлупы яиц. В результате получают количество микроорганизмов (КОЕ/см<sup>2</sup>) на 1 см<sup>2</sup> скорлупы яиц.

## 19.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖИМОГО ЯИЦ

Перед микробиологическим исследованием содержимого яиц поверхность скорлупы обмывают теплым 0,2% -ным раствором каустической соды или 0,5% -ным раствором кальцинированной соды в течение 2 мин. После мойки яйцо ополаскивают водопроводной водой, дают стечь и погружают в 70% -ный спирт на 10 мин, после чего обжигают в пламени.

На остром конце яйца делают отверстие диаметром около 1 см и снова обжигают, содержимое одного или нескольких яиц выливают в колбу и гомогенизируют с помощью бус или пипеток до однородной консистенции. Исследование проводят сразу, для этого 10 мл яичной массы переносят в колбу, содержащую 90 мл стерильного физраствора, — это исходное разведение 1:10, из которого переносят 1 мл в пробирку с 9 мл физраствора,

получая разведение 1:10, 1:100 и т. д. до нужного конечного разведения.

Микробиологическое исследование содержимого яиц сводится к определению МАФАНМ, выявлению БГКП, золотистого стафилококка, протей, сальмонелл, в некоторых случаях *B. cereus*.

### Определение МАФАНМ

Для определения МАФАНМ (КОЕ/г или КОЕ/мл) по 1 мл полученных разведений вносят параллельно в чашки Петри (по две чашки на каждое разведение) и заливают расплавленным и охлажденным до 45°C МПА. Тщательно перемешивают, после застывания инкубируют при 30°C в течение 72 ч. Подсчитывают все выросшие колонии, по результатам подсчета определяют среднее арифметическое значение числа колоний из всех посевов одного разведения.

Количество КОЕ в 1 г яичных продуктов определяют по формуле

$$X = \frac{A \cdot x \cdot 10^n}{V},$$

где  $A$  — среднее арифметическое число колоний в чашке;  $n$  — степень десятикратного разведения продукта;  $V$  — объем посевного материала, внесенного в чашку.

### Выявление БГКП

Для этого проводят посев по 1 мл натурального продукта и из разведений 1:10, 1:100 в среду Кесслера, посевы культивируют 24 ч в термостате при 37°C. Из пробирок с признаками роста делают посев на среду Эндо и выдерживают 24 ч при 37°C. Затем посеvy просматривают и отмечают рост колоний, характерных для БГКП, не менее чем из трех характерных колоний готовят препара-

раты, окрашивают по Граму и микроскопируют. Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. Обнаружение на среде Эндо колоний с характерными признаками роста, наличие в мазках колоний грамтрицательных палочек, сбрасывающих лактозу, указывает на присутствие в продукте БГКП.

Результат записывают следующим образом: не обнаружены (или обнаружены) БГКП в 0,1 мл жидких (в 0,1 г сухих) яичных продуктов.

### **Индикация сальмонелл**

25 мл натурального продукта вносят в колбу, содержащую 225 мл среды обогащения (Кауфмана, магниевой или селенитовой), встряхивают, термостатируют при 37°C в течение 20 ч. Затем из среды обогащения бактериологической петлей проводят высев в чашки Петри с ВСА (средой Плоскирева, Левина), выдерживают в термостате. Учет результатов проводят на ВСА через 48 ч, а на средах Плоскирева, Левина — через 24 ч. Из типичных для сальмонелл колоний берут не меньше трех и пересевают в пробирки с МПА, МПБ и на дифференциальную среду Кrumвиде — Олькеницкого или Клигlera. Среды Кrumвиде — Олькеницкого или Клигlera засевают штрихом на скошенную поверхность, а затем уколом в глубину столбика. Посевы инкубируют сутки в термостате при 37°C.

Выросшие колонии с поверхности дифференциальных сред используют для постановки РА и приготовления мазков. У полученных культур изучают морфологические, тинкториальные, ферментативные свойства, способность образовывать сероводород и другие свойства, характерные для бактерий рода *Salmonella*.

Микробиологические показатели яиц и яичных продуктов регламентированные Санитарными правилами и нормами, представлены в таблице 16.

Таблица 16

**Нормативы микробиологических показателей яиц и яичных продуктов**

Продукт	МАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускается наличие			
		БГКП	<i>S. au- reus</i>	<i>Proteus</i>	<i>Salmo- nella</i>
Яйцо куриное, перепелиное, диетическое	$5 \cdot 10^3$	0,1	—	—	25
Яйцо куриное, столовое	$5 \cdot 10^3$	0,01	—	—	25
Меланж яич- ный, мороже- ный	$5 \cdot 10^3$	0,1	1	1	25

### 19.3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЯИЧНЫХ ПРОДУКТОВ

**Яичные мороженые продукты.** При микробиологическом исследовании яичных мороженых продуктов (меланжа, белка, желтка) для проверки соответствия качества яичных мороженых продуктов требованиям действующей нормативно-технической документации из разных мест партии отбирают 3% ящичков, но не менее шести. Из общего количества отобранных ящичков отбирают по одному пакету, банке из каждого отобранного в выборку ящичка. Из разных мест каждого пакета, банки стерильным масляным щупом отбирают не менее четырех столбиков продукта в стерильную посуду. Перед проведением микробиологического исследования пробы размораживают в водяной бане при температуре не выше 45°C до температуры внутри продукта не выше 1–5°C.

Отобранные пробы соединяют, тщательно перемешивают и получают объединенную пробу массой не более

0,5 кг, которую помещают в стерильную посуду с притертой пробкой. Из объединенной пробы отбирают 100 г продукта для проведения микробиологического анализа, остальную часть используют для проведения органолептических и физико-химических методов анализа.

**Яичные сухие продукты.** Для оценки санитарно-микробиологического качества яичных сухих продуктов из разных мест исследуемой партии отбирают 3% единиц упаковки, но не менее трех единиц. Из разных мест отобранной в выборку упаковочной единицы отбирают не менее трех точечных проб, взятых в равном количестве.

Отбор проб осуществляют щупом, черпаком, ложкой, металлической трубкой, шпателем или другим приспособлением, которые каждый раз перед использованием стерилизуют фламбированием или заранее в автоклаве.

Масса пробы, отобранной из каждой бочки, мешка, ящика или банки, должна быть 200 г. От партии сухого яичного продукта, фасованного в пакеты, отбирают из разных мест каждого отобранного в выборку ящика по три пакета. Пробы соединяют, тщательно перемешивают, подвергают квартованию и получают объединенную пробу массой 0,5 кг.

Объединенную пробу яичного порошка делят на две равные части, которые помещают в чистые стерильные стеклянные банки с притертыми пробками или полиэтиленовые пакеты.

Одну часть пробы направляют в лабораторию для исследования, другую пломбируют, снабжают этикеткой и хранят один месяц при температуре не выше 20°C и относительной влажности 65–75% на случай разногласий при определении качества сухого яичного продукта. На этикетке указывают: наименование предприятия-изготовителя; наименование продукта; дату выработки; номер и размер партии; дату и место отбора проб; фамилию лиц, отобравших пробу; обозначение действующего нормативно-технического документа.

Из объединенной пробы в стерильную посуду отбирают 100 г сухого яичного продукта для проведения анали-

за, остальную часть пробы используют для проведения органолептических и физико-химических анализов.

Для приготовления разведений навеску сухих яичных продуктов массой 10 г вносят в колбочку с 90 мл стерильного физраствора, соблюдая правила асептики, и готовят серию десятикратных разведений яичных продуктов в зависимости от предполагаемого обсеменения продукта.

При несоответствии качества яиц и яйцепродуктов по микробиологическим показателям их направляют на выработку термически обрабатываемых продуктов.

Все пробы яйцепродуктов исследуют на количество МАФАНМ, на БГКП, на сальмонеллы по микробиологическим методам, указанным выше.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести бактериологическое исследование скорлупы исследуемых яиц.
2. Провести бактериологическое исследование содержимого яиц для определения количества МАФАНМ.
3. Провести индикацию БГКП в содержимом яиц.
4. Провести индикацию сальмонелл в содержимом яиц.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Какие особенности правила отбора куриных яиц для исследования вы знаете?
2. Суть санитарно-микробиологического исследования содержимого яиц.
3. В чем суть индикации кишечной палочки в яйцах?
4. В чем суть индикации сальмонелл в яйцах?

# **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА РЫБЫ И МОРЕПРОДУКТОВ**

**Цель.** Овладеть методами бактериологического контроля технологического процесса производства рыбы и морепродуктов.

**Материалы и оборудование.** Свежая рыба средних размеров, МПА и МПБ в пробирках, МПА высоким столбиком, стерильные чашки Петри, чашки Петри с агаром Эндо, спиртовки, петли, предметные стекла, набор красок по Граму, фуксин 1:5.

## **20.1. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА СВЕЖЕЙ, ОХЛАЖДЕННОЙ, МОРОЖЕНОЙ РЫБЫ И МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ**

Мышцы рыб в нормальных условиях стерильны. Порча продукта наступает после гибели рыбы. В отличие от мяса теплокровных животных, порчу которых вызывают преимущественно мезофильные гнилостные микроорганизмы, возбудителями гнилостного разложения рыбы являются чаще психрофильные бактерии, развитие которых наступает при низкой температуре. Поэтому рыба представляет продукты еще более подверженные порче, чем мясо животных и птиц.

Микроорганизмы попадают через жабры, кишечник, особенно в период агонии. Микроорганизмы, находящиеся на поверхности тела рыбы, покрытой слизью, являющейся хорошим питательным субстратом для их развития, быстро размножаются и со временем проникают в глубь мягких тканей. Особенно обильно загрязняется рыба при вскрытии брюшка, так как при этом неизбежно повреждается кишечник.

Оценку качества поступившей рыбы проводят в три этапа:

1) визуальная и органолептическая оценка качества рыбы;

2) микроскопическое исследование рыбы проводят для объективной оценки, если доброкачественность рыбного сырья вызывает сомнение;

3) микробиологическое исследование рыбы проводят при стойкой повышенной обсемененности готовой продукции.

Метод микробиологического анализа для определения количества бактерий основан на подсчете колоний, выросших на питательных средах при культивировании посевов в термостате.

1. Свежая рыба имеет красные жабры, светлые выпуклые глаза, специфический рыбный запах. На разрезе мышечная ткань эластичная, плотной консистенции, ямка от надавливания быстро выравнивается и исчезает. Несвежая рыба имеет темно-бурые жабры, мутные запавшие глаза, дряблую консистенцию, неприятный гнилостный запах, внутренние органы распавшиеся, кишечник лизированный.

2. Перед микроскопическим исследованием рыбы кожу посередине спины или ближе к голове освобождают от чешуи и прижигают раскаленным скальпелем. Затем стерильным скальпелем вырезают кусочки рыбы площадью около  $1,5 \text{ см}^2$  и толщиной  $1,5\text{--}2 \text{ см}$ . Кусочком мякоти делают препарат-отпечаток на предметном стекле. Отпечаток мышечной ткани фиксируют над пламенем горелки, окрашивают простым методом и просматривают не менее 10 полей зрения под иммерсией.

В препаратах-отпечатках, приготовленных из свежей рыбы, не заметны остатки разложившейся мышечной ткани, в одном поле зрения могут встречаться единичные кокки и палочки. У рыбы подозрительной свежести в мазках из поверхностных слоев мышц находят 30–60, а в мазках из глубинных слоев 20–30 диплококков. На стекле заметны следы распавшейся ткани мышц.

3. При стойкой повышенной обсемененности готовой продукции для выявления источников обсеменения проводят микробиологическое исследование сырья. Контроль включает определение в сырье количества МАФАНМ, дополнительно определяют наличие БГКП, золотистых стафилококков, сальмонелл и паразитических вибрионов. Микробиологические анализы морских беспозвоночных (устриц, мидий и др.), подготовленных к реализации в живом виде, проводятся систематически, при этом контролируется каждая партия.

В таблице 17 приведены микробиологические нормативы количества МАФАНМ, БГКП, золотистого стафилококка и сальмонелл.

Таблица 17

**Микробиологические нормативы свежей рыбы  
и морских беспозвоночных**

Продукт	МА- ФАНМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		
		БГКП	золоти- стый ста- филококк	патогенные, в том числе сальмонеллы*
Рыба свежая, охлажденная, мороженая	$5 \cdot 10^4$	0,001	0,01	25
Морские бес- позвоночные	$1 \cdot 10^5$	0,001	0,01	25
Икра осетро- вых	$1 \cdot 10^4$	1,0	—	—

*Примечание.* \* Паразитические вибрионы, листерии должны отсутствовать в 25 г морских беспозвоночных, подготовленных к реализации в живом виде.

## Определение количества МАФАНМ

**Отбор проб.** Исследуемую рыбу и крупные экземпляры нерыбных объектов морского промысла отбирают в количестве не более 3 штук. От каждого экземпляра из нескольких мест вырезают кусочки с кожей и мышцами, не затрагивая кишечник (за исключением отбора проб на определение наличия паразитических вибрионов), площадью около  $4 \text{ см}^2$ , толщиной 4–5 мм и эти кусочки помещают во взвешенный стакан. Вновь взвешивают и по разности весов устанавливают массу отобранной пробы, ножницами измельчают и пробу заливают стерильным физраствором в таком количестве, чтобы получить конечное разведение 1:10.

Подготовленную пробу тщательно перемешивают, взвесь отстаивают в течение 5 мин. Надсадочную жидкость используют для приготовления последующих разведений. 1 мл из исходного разведения ( $10^{-1}$ ) переносят в пробирку с 9 мл стерильного раствора, не прикасаясь к поверхности жидкости в этой пробирке, перемешивание (или пипетирование) проводят новой стерильной пипеткой, и содержимое в количестве 1 мл переносят в следующую пробирку. В результате исследуемый продукт должен быть разведенным в 10, 100 и более раз. Степень разведения навески для высева на плотные питательные среды выбирают так, чтобы общее количество колоний, выросших на чашке, колебалось в пределах от 30 до 300. Посев проводят по следующей методике: из двух последних разведений вносят в чашки Петри по 1 мл разведенного материала или смыва, заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до  $50^\circ\text{C}$  агара, перемешивают (из каждого разведения посев дублируют в три чашки). После застывания МПА чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат при  $30^\circ\text{C}$  на 72 ч. В некоторых случаях допускается предварительный учет колоний через 48 ч с окончательным подсчетом через 72 ч. Количество микроорганизмов в 1 г (1 мл) продукта определяют по формуле

$$K = A \cdot B \cdot C,$$

где  $K$  — количество микроорганизмов в 1 г, КОЕ;  $A$  — среднее арифметическое число колоний в чашке;  $B$  — степень разведения;  $C$  — масса, объем, поверхность (г, мл).

Результаты выражают в колониеобразующих единицах — КОЕ/(мл, г).

Для вычисления среднего арифметического нельзя использовать посева, где количество выросших колоний на чашках менее 30.

При отсутствии роста колоний результаты фиксируют таким образом: «Количество микроорганизмов менее одного».

Если при посевах оказалось, что во всех разведениях на засеянных чашках менее 30 колоний, в результате анализа рекомендуется написать: «Рост единичных колоний при посеве» и указать количество засеянного продукта.

Если на поверхности чашек, более чем на 1/2 их площади, имеется расплзающийся рост спорообразующих микроорганизмов, подсчет изолированных колоний невозможен, в результате анализа следует написать: «Рост спорообразующих микроорганизмов».

### **Определение бактерий группы кишечных палочек**

Метод основан на способности бактерий группы кишечных палочек сбраживать в среде Кесслера лактозу с образованием кислоты и газа. Бактерии группы кишечных палочек (БГКП) — это аэробные и факультативно-анаэробные, грамотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37°C в течение 24 ч (бродильная проба), не обладающие окислительной способностью.

Для индикации БГКП в исследуемом материале 10 г продукта и 10 мл исходного разведения продукта засевают во флаконы со 100 мл и 50 мл питательной среды соответственно. По 1 мл и 0,1 мл и т. д. исходного раз-

ведения продукта вносят в пробирки с 5 мл питательной среды. Засевается то количество продукта, в котором нормируется отсутствие бактерий группы кишечных палочек. Допускается засеивать 1 г продукта в 10 мл питательной среды.

Для определения БГКП в смывной жидкости с оборудования и рук тампоны или марлевые салфетки опускают в пробирки с 5 мл среды Кесслера. Посевы помещают в термостат при температуре 37°C на 24 ч, затем из пробирок и колб с пузырьками газа в поплавках делают пересев на дифференциально-диагностическую среду Эндо. Через сутки после инкубирования в термостате проводят учет. При наличии на среде Эндо колоний (красных с металлическим блеском и без него, розовых), характерных для группы кишечных палочек, проводят их изучение. Из изолированных колоний готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии грамотрицательных без спор палочек делают заключение о присутствии БГКП. Для уточнения при обнаружении грамотрицательных, не образующих спор палочек надо провести оксидазный тест: часть колонии со среды Эндо наносят штрихом на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную реактивом для определения цитохромоксидазы. Оксидазный тест у кишечной палочки отрицательный и индикаторная бумага не должна изменять цвет (если бумага синее — оксидазный тест положительный).

### **Индикация наличия золотистых стафилококков**

Метод основан на выявлении характерного роста бактерий на элективных средах, изучении морфологических свойств, наличии фермента плазмокоагулазы.

1 г продукта и 1 мл разведения ( $10^{-1}$ , т. е. 0,1 г продукта) вносят в пробирку с 6–7 мл солевого рыбопептонного бульона (7% NaCl). При исследовании соленых продуктов (свыше 5%) дополнительно проводят посев в 1% -ный глюкозный РПБ. Посевы помещают в термостат

при температуре 37°C на 24 ч. Из сред обогащения (солевого, глюкозного бульонов) проводят посев на элективные среды: желточно-солевой или молочно-солевой агар или среду Байрда — Паркера. Посевы выдерживают при 37°C в течение 24 ч.

Из типичных для стафилококков колоний (на молочно- и желточно-солевом агаре они с радужным венчиком вокруг колоний; на среде Байрд — Паркер — они черные, блестящие с узким белым краем, окруженные прозрачной зоной) делают препараты, окрашивают по Граму, микроскопируют; оставшуюся часть колонии отсевают на скошенный агар в пробирках для получения чистой культуры и инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ч. С суточной культурой ставят реакцию плазмокоагуляции.

**Методика реакции плазмокоагуляции.** В пробирку с 0,5 мл кроличьей плазмы, разведенной физраствором в соотношении 1:5 (1 мл плазмы + 4 мл физраствора), вносят петлю суточной культуры стафилококка. Для контроля одну из пробирок с плазмой оставляют незасеянной. Пробирки помещают в термостат при температуре 37°C. Учет реакции плазмокоагуляции проводят через 2, 4 ч. Реакция считается положительной, если сгусток образовался в течение 24 ч.

### **Индикация наличия бактерий рода Сальмонелл**

Метод основан на способности бактерий рода Сальмонелл, расти на дифференциально-диагностических средах и давать реакцию агглютинации со специфическими сальмонеллезными сыворотками.

Навеску продукта в количестве 25 г засевают в 100 мл среды обогащения (магниевую или селенитовый бульон), учитывая небильное обсеменение продукта сальмонеллами. Посевы помещают на 18–20 ч в термостат при температуре 37°C.

На второй день исследования из проросших сред обогащения делают пересев на плотные дифференци-

ально-диагностические среды в чашках Петри: висмут-сульфитный агар (ВСА), среду Левина или Эндо. Перед посевом среду необходимо подсушить в термостате, чтобы колонии не сливались и были изолированные. Посевы на средах Эндо и Плоскирева термостатируют в течение 15–18 ч, на среде ВСА — 48 ч при 37°C.

На ВСА сальмонеллы образуют черные с металлическим блеском колонии, цвет питательной среды под колониями черный. Исключение составляют *S. paratyphi*, *S. cholerae-suis* и ряд других, растущих в виде мелких серовато-зеленых колоний с черным центром и без него. Кишечная палочка на ВСА образует бесцветные, зеленоватые или серые колонии или не дает роста.

На среде Эндо колонии сальмонелл бесцветные, слабо-розовые, выпуклые. На средах Плоскирева и Левина колонии прозрачные, голубоватые, бледные или нежно-розовые.

С дифференциально-диагностических сред отсевают несколько колоний на трехсахарный агар с мочевиной или среду Клиглера с мочевиной: посевы делают сначала штрихом по скошенной поверхности, а затем уколom в столбик. Посевы выдерживают в термостате при температуре 37°C 24 ч. На этих средах учитывают способность культуры ферментировать глюкозу, лактозу и мочевины. Готовая среда — трехсахарный агар с мочевиной — имеет розовый цвет. Отсутствие изменения цвета скошенной поверхности указывает на то, что лактоза и сахароза не разлагаются исследуемой культурой. Желтое окрашивание столбика, образование газа (разрывы в глубине агара) и сероводорода (почернение) указывают на рост бактерий рода Сальмонелл.

Желательно со среды Клиглера или с трехсахарного агара отсеять выросшую культуру на скошенный агар, короткий пестрый ряд, включающий среды Гисса с лактозой, глюкозой, маннитом, сахарозой, мальтозой. Для определения индола и сероводорода посев делают на рыбо- или мясopептонный бульон, после чего над посевом между пробкой и стенкой пробирки закрепляют две полоски фильтровальной бумаги, одна из них смоченна

уксуснокислым свинцом для определения сероводорода, а другая — раствором щавелевой кислоты для определения индола. Посевы термостатируют при температуре 37°C в течение 24 ч.

Таким образом, к сальмонеллам относятся бактерии, не разлагающие лактозу, сахарозу и мочевины, ферментирующие глюкозу, маннит и мальтозу с образованием газа, продуцирующие сероводород и не образующие индол.

Для окончательного заключения с выделенной культурой ставят РА на предметном стекле с поливалентной, О- и Н-агглютинирующими монорецепторными сальмонеллезными сыворотками. В случае положительной реакции агглютинации с монорецепторными О- и Н-агглютинирующими сыворотками делают окончательный вывод о присутствии в исследуемом продукте сальмонелл.

### **Индикация паразитических вибрионов**

Метод основан на выявлении типичных колоний на дифференциально-диагностическом агаре (ДДА) определенного состава и установления принадлежности бактерий к паразитическим вибрионам по морфологическим и биохимическим свойствам. Для исследования на сальмонеллы, листерии и паразитические вибрионы пробы сырья отбирают с частью кишечника и жабер. Из усредненной пробы отбирают навеску в 25 г. Паразитические вибрионы, листерии должны отсутствовать в 25 г морских беспозвоночных, подготовленных к реализации в живом виде.

Для индикации присутствия паразитических вибрионов в исследуемой рыбе пробу в количестве 25 г вносят в колбу со 100 мл жидкой среды обогащения. Посевы помещают в термостат при 37°C, через 24 ч проводят пересев из проросшей жидкой среды на поверхность плотного ДДА. Чашки инкубируют при 37°C, через сутки выявляют типичные колонии паразитических вибрионов.

Для идентификации вибриона делают пересев изолированных колоний с ДДА в чашках в 1% -ную пептонную воду с 3% хлорида натрия, на которой парагемолитический вибрион дает помутнение с образованием нежной голубой пленки, и на ДДА в пробирках.

Для подтверждения принадлежности выделенных на ДДА микроорганизмов к парагемолитическим вибрионам проводят изучение морфологических и биохимических свойств.

Парагемолитические вибрионы — мезофильные грамотрицательные палочки, прямые или слегка изогнутые, не образующие спор, активно подвижные, содержат цитохромоксидазу, не расщепляют лактозу и сахарозу, растут на питательных средах с содержанием хлорида натрия от 3 до 8%, декарбоксилируют лизин, образуют индол, ферментируют (без газообразования) арабинозу, глюкозу, мальтозу, не образуют ацетилметилкарбинол.

Подвижность изучают под фазово-контрастным микроскопом в «раздавленной капле» или при посеве в полужидкий МПА (0,25% агара), содержащий 3% хлорида натрия. Засевают суточную бульонную культуру в полужидкий МПА и инкубируют при температуре 37°C в течение 24 ч. Подвижные формы образуют диффузное помутнение, слабоподвижные — вырастают по ходу укола.

## 20.2. МОРЕПРОДУКТЫ

**Устрицы** относятся к семейству морских моллюсков класса двустворчатых, размеры от 6 до 45 см, съедобные, многие виды являются объектом промысла, применяют в пищу только в живые. Для проверки состояния устрицы лезвие ножа с силой, но аккуратно вводят в едва различимую темноватую линию из ресничек и перерезают определенные мускулы — если тело дрогнет, устрица живая.

Для улучшения вкуса устрицы перед применением необходимо выдержать в специальных резервуарах с чистой морской водой и специальными водорослями,

все это проводят в течение одного-двух месяцев на юге Франции. Но при транспортировке устриц из Франции в Россию часто нарушается режим хранения, происходит обсеменение устриц различной микрофлорой, такие устрицы вызывают пищевое отравление.

Для этого вида продукта также должны быть составлены нормативы.

**Японская рыба фугу** тоже вызывает пищевые отравления, но не микробной этиологии, она сама по себе очень ядовита — ее печень, молока, икра, глаза и кожа содержат яд тетродотоксин, который в 25 раз сильнее знаменитого кураре. Противоядия не существует. Чем же объясняется большой интерес потребителей к этой рыбе в московских ресторанах? Оказывается, неядовитые части фугу считаются наделенными удивительной целебной силой, предотвращающей старение. Поэтому, несмотря на ежегодные отравления этой рыбой в самой Японии, в рыбных ресторанах записываются на блюда из фугу чуть ли не за месяц. Высший пилотаж — это когда повар оставляет в рыбе ровно столько яда, чтобы вызвать у едока чувство легкого наркотического оцепенения. Любители **добровольного** пищевого отравления тетродотоксином описывают свои удивительные ощущения так: сначала отнимаются ноги, потом руки, последними — челюсти. Двигаются только глаза. Потом все оживает — в обратном порядке, вот ради этого «воскрешения» любители и идут на риск. Это пищевое отравление не микробного происхождения, поэтому при бактериологическом анализе этой рыбы следует проводить традиционные исследования на количество МАФАНМ, индикацию БГКП, СРК.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести органолептическую оценку исследуемой рыбы.
2. Провести микроскопию препаратов, приготовленных из исследуемой рыбы, оценить качество рыбы.

3. Провести посев исследуемой рыбы с целью определения количества МАФAnM.

4. Провести посев исследуемой рыбы на среды обогащения с целью индикации сальмонелл и БГКП.

5. Провести индикацию наличия параземолитических вибрионов в исследуемой рыбе.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Правила отбора проб рыбы для микробиологического исследования.

2. В чем суть методики индикации кишечной палочки в исследуемой рыбе?

3. В чем суть индикации золотистого стафилококка в рыбе?

4. Особенности индикации параземолитического вибриона в исследуемой рыбе.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА МОЛОКА. ПОКАЗАТЕЛИ СОРТА МОЛОКА

**Цель занятия.** Овладеть методами бактериологического контроля технологического процесса производства молока.

**Материалы и оборудование.** Для определения общего микробного числа в 1 мл: пробы сырого и пастеризованного молока, пробирки со стерильным физраствором по 9 мл для метода серийных разведений, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 и 2 мл, пробирки с расплавленным МПА столбиком. Для изучения механической загрязненности молока: специальные фильтры для молока.

Для постановки редуктазной пробы: исследуемое молоко по 10 мл, метиленовая синь в рабочем разведении в пробирках с пипетками, водяная баня (редуктазник).

Для обнаружения ингибирующих веществ (антибиотиков) в молоке: исследуемое молоко, в одну из пробирок добавлен антибиотик, рабочий раствор резазурина в пробирках с пипетками, культура термофильного молочнокислого стрептококка в пробирках с пипетками, редуктазник.

## 21.1. ИНДИКАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ В МОЛОКЕ

### 21.1.1. Бактериологическое исследование молока

Сорт молока зависит от количества МАФАНМ в 1 мл молока. По Санитарным правилам и нормам (СанПиН 2.3.2.1078-01) сырое молоко подразделяют на:

- высший сорт — не более 300 000 бактерий в 1 мл;
- первый сорт — не более 500 000 бактерий в 1 мл;
- второй сорт — не более 4 000 000 в 1 мл.

Для определения количества бактерий в 1 мл молока бактериологическим методом применяют следующую методику: 1 мл сырого молока вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды — получается первое разведение  $1:10$  ( $10^{-1}$ ), из которого 1 мл переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды — получается разведение  $1:100$  ( $10^{-2}$ ) и т. д. до разведения  $1:10^{-6}$ , т. е. до миллиона. Из двух последних разведений ( $10^{-5}$  и  $10^{-6}$ ) по 1 мл вносят одновременно в две чашки Петри (в двух повторях), каждую заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до  $45^{\circ}\text{C}$  МПА, перемешивают путем легкого вращательного покачивания и после застывания агара их помещают в термостат при температуре  $30^{\circ}\text{C}$  на 24–48 ч. После этого подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке, определяют среднеарифметическое число по двум чашкам. Число колоний, выросших в каждой чашке, пересчитывают, умножают на степень разведения и определяют количество бактерий в 1 мл исследуемого молока. Таким образом сорт молока бактериологическим методом можно установить **лишь через сутки** после приема молока на молочном заводе. Но никакое производство не может себе этого позволить. Поэтому на молочном заводе сорт молока определяют **быстро, косвенным путем**. Для этого при приеме молока учитывают комплекс признаков: кислотность молока в  $^{\circ}\text{T}$ , редуктазную пробу, степень чистоты по эталону и количество соматических клеток (табл. 18).

Таблица 18

## Показатели сорта молока

Показатели	Норма для сорта			
	высший	первый	второй	несортной
Кислотность молока, °Т	16–18	16–18	16–20	Не более 21
Степень чистоты по эталону	1	1	2	3
Бактериальная обсемененность по редуцтазной пробе	1	1	2	3
Соматических клеток	До 500 тыс.	Свыше 500 тыс.	До 1 млн	—
Температура молока	Должна быть ниже 10°C			

На все показатели, по которым производится контроль качества принимаемого молока, следует обращать самое серьезное внимание, так как оценка молока при сдаче осуществляется по худшему из них. Так, если по редуцтажной пробе молоко относится к первому классу, по степени чистоты — к первой группе, а кислотность повышена, например до 20°Т, то молоко будет отнесено ко второму сорту.

### 21.1.2. Кислотность молока

Она служит одним из основных показателей санитарного качества молока, по которому при приеме осуществляется сортировка молока. Кислотность молока напрямую связана с бактериальной обсемененностью. Свежее молоко имеет нейтральную реакцию и почти не содержит в своем составе молочной кислоты.

Кислотность молока обозначают в условных градусах Тернера (°Т). Под условными градусами понимают количество миллилитров 0,1 М раствора натрия (калия) едкого, необходимых для нейтрализации 100 мл молока, разбавленного вдвое дистиллированной водой при индикаторе фенолфталеине.

Показатель титруемой кислотности позволяет установить повышение кислотности в результате размножения молочнокислых бактерий, сбразивающих лактозу до молочной кислоты. Чем дольше хранится молоко в неохлажденном состоянии, при температуре выше  $+10^{\circ}\text{C}$ , тем больше в нем накапливается молочной кислоты, тем выше его кислотность. Нормальная кислотность свежего молока колеблется от 16 до  $18^{\circ}\text{T}$ . При кислотности выше  $21^{\circ}\text{T}$  начинается первая степень порчи молока — *прокисание*. Такое молоко не выдерживает тепловой обработки и не может быть сырьем для выработки стандартных молочных продуктов.

### 21.1.3. Определение степени чистоты

Показателем санитарных условий получения молока является степень чистоты молока, которая характеризуется наличием посторонних механических примесей.

**Методика.** Через специальный плотный фильтр пропускают 250 мл молока и сравнивают полученный осадок на фильтре с эталоном. Молоко по степени загрязненности делят на следующие группы:

- 1-я — на фильтре нет частиц механической примеси;
- 2-я — на фильтре отдельные частицы механической примеси;
- 3-я — на фильтре заметный осадок (волоски, частицы сена, песка).

### 21.1.4. Проба на редуктазу

Проба на редуктазу является косвенным методом определения общей микробной обсемененности молока, основанном на изменении биохимических показателей.

Преимущество этого метода — простота и быстрота проведения анализа по сравнению с бактериологическим исследованием.

Суть этого метода заключается в том, что микроорганизмы, попавшие в молоко, в процессе жизнедеятельности выделяют в окружающую среду анаэробные дегидрогеназы, которые по старой классификации называются редуктазами. Существует зависимость между общим количеством бактерий в молоке и содержанием в нем редуктазы, что позволяет использовать редуктазную пробу как косвенный показатель бактериальной обсемененности сырого молока. Фермент редуктаза обладает способностью восстанавливать метиленовую синь, которая при этом обесцвечивается. В присутствии редуктазы молоко, окрашенное метиленовым синим, обесцвечивается. Следовательно, чем больше бактерий в исследуемом молоке, тем больше редуктазы, тем быстрее оно обесцвечивается.

**Методика.** В пробирки наливают 10 мл исследуемого молока и 0,5 мл рабочего раствора метиленовой сини, закрывают резиновой пробкой, смешивают путем трехкратного переворачивания пробирки (молоко при этом окрашивается в синий цвет). Пробирки с исследуемым молоком помещают в водяную баню при 38–40°C.

Наблюдение за изменением окраски ведут через 20 мин, через 2 ч, через 5,5 ч после начала анализа. Проба на редуктазу считается законченной, когда наступает полное обесцвечивания молока. В бактериально чистом молоке фермента редуктазы содержится очень мало, поэтому оно обесцвечивается долго. В зависимости от времени обесцвечивания метиленовой сини молоко относится к одному из четырех классов в соответствии с таблицей 19.

Таблица 19

Классификация молока по редуктазе

Клас-сы	Оценка качества молока	Продолжительность обесцвечивания	Кол-во бактерий в 1 мл молока
1	Хорошее	Свыше 5,5 ч	Менее 500 тыс.
2	Удовлетворительное	От 2 до 5,5 ч	От 500 тыс. до 4 млн
3	Плохое	От 20 мин до 2 ч	От 4 до 20 млн
4	Очень плохое	20 мин и менее	20 млн и выше

## 21.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В МОЛОКЕ

Молочные предприятия не принимают молоко с консервирующими веществами, содержащими антибиотики и другие ингибирующие вещества. Эти вещества задерживают или подавляют (ингибируют) развитие молочнокислых микроорганизмов, применяемых для выработки кисломолочных продуктов.

Для определения в молоке формалина, перекиси водорода, антибиотиков предложена резазуриновая проба. Сущность метода заключается в том, что микроорганизмы *Str. thermophilus*, чувствительные к ингибирующим веществам, размножаясь, выделяют вещества, восстанавливающие резазурин.

**Методика обнаружения антибиотика в молоке.** К 10 мл молока добавляют 1 мл рабочего раствора резазурина и 3–4 капли термофильного стрептококка (*Str. thermophilus*), чувствительного к антибиотикам. Содержимое пробирок перемешивают, молоко окрашивается в фиолетовый цвет. Пробирки ставят в редуктазник (водяную баню) при 40°C и через 45 мин учитывают изменение цвета молока.

Заключение о качестве молока делают по следующим изменениям:

- сине-стальной или фиолетовый цвет исследуемого молока в пробирке указывает на наличие антибиотиков (ингибирующих веществ) в молоке. Наблюдается ингибирование размножения молочнокислого стрептококка, поэтому молочная кислота не выделяется и цвет индикатора не изменяется;
- белый или розовый цвет молока указывает на то, что в молоке нет антибиотиков, так как молочнокислый стрептококк беспрепятственно размножается, образует молочную кислоту, которая обесцвечивает резазурин.

### 21.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПАСТЕРИЗАЦИИ

В торговую сеть молоко поступает в пастеризованном виде. Цель пастеризации — уничтожить гнилостные и молочнокислые бактерии, чтобы продлить срок хранения молока. Режимы пастеризации, принятые в молочной промышленности, обеспечивают полное уничтожение возбудителей туберкулеза, бруцеллеза, условно патогенных микроорганизмов и кишечной палочки. На производстве применяется несколько режимов пастеризации молока: кратковременная — 74–76°C в течение 15–20 с; моментальная — 85–90°C без выдержки.

После пастеризации всю партию молока необходимо охладить до +4°C, что препятствует прорастанию спор и развитию оставшейся термофильной микрофлоры.

Микробиологический контроль эффективности пастеризации молока проводят в соответствии с действующей инструкцией, при этом определяют:

- 1) количество микробов в 1 мл молока (МАФАНМ);
- 2) коли-титр и бродильный титр.

Для определения эффективности пастеризации проводят два анализа: посев сырого молока и посев молока из этой же партии после пастеризации.

Количество МАФАНМ определяют в 1 мл исследуемого сырого молока и в 1 мл молока после пастеризации, результаты сравнивают и определяют эффективность пастеризации при данном режиме. Эффективность пастеризации считается достигнутой, если объем остаточной микрофлоры не превышает 0,01% от первоначальной.

Вначале готовят шесть пробирок с 9 мл стерильной воды, в первую вносят 1 мл исследуемого сырого молока, получившееся разведение  $10^{-1}$ , тщательно перемешивают стерильной пипеткой и переносят 1 мл во вторую пробирку с 9 мл воды, получается разведение молока  $10^{-2}$ , и т. д. готовят ряд последовательных разведений до  $10^{-6}$ . Из двух последних разведений —  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  вносят по 1 мл в чашки Петри (в двух повторах) и заливают 15 мл

расплавленного и охлажденного до 50°C мясопептонного агара, содержимое чашек перемешивают путем легкого вращательного покачивания и после застывания среды чашки помещают в термостат вверх дном при 30°C на 48 ч.

По такой же методике проводят бактериологический посев пастеризованного молока, только разведения доводят до  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  и  $10^{-3}$ . Из двух последних разведений делают посев по 1 мл в чашки Петри в двух повторах, заливают расплавленным агаром, термостатируют 48 ч при 30°C. Количество выросших колоний в каждой чашке подсчитывают, определяют среднеарифметический показатель из двух дублирующих посевов. Для подсчета берут только те чашки, количество колоний в которых не менее 30 и не более 300.

Общее количество МАФАНМ в 1 мл сырого молока определяют умножением количества выросших колоний на степень разведения.

Для определения эффективности пастеризации сравнивают результаты анализа сырого молока с результатами пастеризованного молока, определяют объем остаточной микрофлоры, который не должен превышать 0,01% от первоначальной. В соответствии с действующим стандартом пастеризованное молоко должно отвечать требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 (Санитарные правила и нормы). Нормативы представлены в таблице 20.

Таблица 20

## Нормативы на допустимое количество бактерий в молоке

Продукт	Количество МАФАНМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются патогенные бактерии		Примечание
		БГКП	листерии, сальмонеллы	
Молоко, пастеризованное в потребительской таре	100 000	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 1 г не опускаются

Продолжение табл. 20

Продукт	Количество МАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются патогенные бактерии		Примечание
		БГКП	листерии, сальмонеллы	
Молоко, пастеризованное во флягах	200 000	0,01	25	То же
Сливки, пастеризованные в потребительской таре	100 000	0,01	25	То же
Сливки, пастеризованные во флягах	200 000	0,01	25	То же

В кисломолочных продуктах количество МАФАнМ не определяют из-за наличия специфической флоры, используемой для их изготовления, но обязательно контролируют состав молочнокислых бактерий под микроскопом, соотношение молочнокислых стрептококков и палочек.

## 21.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА МОЛОКА

При определении санитарно-показательных микроорганизмов в молоке учитывают наличие и количество бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

БГКП являются постоянными обитателями кишечного тракта человека и животных, находятся на коже животного, в кормах, почве и подстилке, поэтому получить молоко без кишечной палочки довольно сложно. При попадании в молоко эти бактерии вызывают различные пороки, изменяя вкус, запах и консистенцию молока.

Для характеристики санитарно-гигиенических условий производства и реализации молока устанавливают степень обсеменения продукта бактериями группы кишечной палочки, т. е. определяют коли-титр.

*Титр* — это наименьшее количество продукта, выраженное в мл (г), в котором обнаружены БГКП. Титр кишечной палочки в молоке и молочных продуктах определяют в три этапа. При этом учитывают цитратотрицательные разновидности кишечных палочек, которые не растут на среде Симмонса.

**Первый этап.** Он заключается в посеве продукта\* в среду Кесслера.

Среду Кесслера разливают в пробирки по 5 мл с поплавками, готовая среда окрашена в фиолетовый цвет. При посеве продукта с наличием кишечной палочки в среду Кесслера она мутнеет, а в поплавках появляется пузырек газа.

Для определения коли-титра проводят посев молока в объеме 3,3 мл в шесть пробирок. Для этого в три пробирки со средой Кесслера вносят по 1 мл молока, а в три оставшиеся — по 0,1 мл молока.

Посевы ставят в термостат при температуре 43°C на 24 ч (при такой температуре растет кишечная палочка только теплокровных).

**Второй этап.** Пробирки с посевами просматривают, отмечают изменения — появление помутнения среды и газа в поплавках. По сумме признаков устанавливают коли-титр исследуемого молока.

Из каждой забродившей пробирки со средой Кесслера делают пересев на среду Эндо с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии, для чего петлей берут минимальное количество посевного материала и проводят посев частым штрихом, чтобы выросли изолированные колонии. Перед посевом дно чашки с агаром Эндо делят на четыре сектора. Из каждой забродившей

---

\* Если проверяют кисломолочный продукт, то его исследуют по этой же схеме, но перед посевом нейтрализуют. Для этого к 10 мл исследуемого кисломолочного продукта добавляют 1 мл 10% -ного раствора питьевой соды.

пробирки со средой Кесслера проводят пересев штрихом в отдельный сектор. Чашки с посевами помещают на сутки в термостат при температуре 37°C.

**Третий этап.** Чашки с посевами на агар Эндо просматривают:

- при отсутствии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП (красных с металлическим блеском, розовых) в продукте *E. coli* отсутствует;
- при наличии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП, а также бесцветных — их изучают.

Готовят препарат из изолированных колоний, окрашивают по Граму и микроскопируют. Если в препарате будут обнаружены мелкие, с закругленными концами грамотрицательные палочки, проводят дальнейшие исследования, цель которых — установление фекальной принадлежности кишечных палочек. Для этого проверенные с каждого сектора колонии отсевают на цитратную среду Симмонса и глюкозопептонную среду (ГПС).

Посевы в среде Симмонса помещают в термостат при 37°C, а ГПС — при 43°C на 24 ч, при этой температуре не размножается кишечная микрофлора водных хладнокровных. Среда Симмонса содержит цитрат натрия и индикатор бромтимолблау, придающий готовой среде травянисто-зеленый цвет. Эшерихии фекального происхождения на этой среде не растут, так как являются цитратотрицательными.

Учет результатов посева колоний с агара Эндо на среде Симмонса:

- изменение зеленого цвета среды на васильковый цвет — свидетельствует о том, что обнаруженные БГКП относятся к цитратположительным разновидностям, которые не учитываются;
- отсутствие роста на цитратной среде Симмонса указывает на присутствие в исследуемом продукте цитратотрицательных разновидностей БГКП, которые учитываются.

Учет результатов посева колоний с агара Эндо на глюкозопептонную среду:

- если в ГПС при 43°C нет брожения, то считают, что в продукте БГКП отсутствуют;
- если в ГПС произошло брожение и одновременно отсутствует рост на среде Симмонса, то считают, что в продукте обнаружена кишечная палочка фекального происхождения.

После учета результатов на ГПС и среде Симмонса вычисляют коли-титр исследуемого молока и молочных продуктов по таблице 21:

1) если ни в одном из засеянных объемов продукта не обнаружено кишечной палочки, то считают коли-титр более 3 мл;

2) если в одном из засеянных объемов по 1 мл продукта обнаружена кишечная палочка, считают, что коли-титр равен 3 мл;

3) если кишечная палочка обнаружена в пяти посевах или во всех объемах продукта, то считают коли-титр менее 0,3 мл;

4) во всех остальных случаях считают коли-титр равным 0,3 мл.

Таблица 21

Коли-титр молока и молочных продуктов

Варианты	Кишечная палочка обнаружена в следующих объемах, в мл						Установленные коли-титры, в мл
	1	1	1	0,1	0,1	0,1	
А	—	—	—	—	—	—	> 3,0
Б	+	—	—	—	—	—	= 3,0
В	+	+	+	+	+	—	< 0,3
	+	+	—	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	

Результаты бактериологического исследования качества готовой продукции из-за длительности анализов не могут быть использованы для задержки выпуска молочной продукции, но по ним судят о санитарно-гигиеническом благополучии предприятия.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести постановку редуктазной пробы с молоком различной бактериальной загрязненности. Оценить качество различных проб молока.

2. Определить наличие ингибиторов в различных пробах молока.

3. Провести бактериологическое исследование сырого и пастеризованного молока. Оценить качество пастеризации.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Какие показатели учитываются при определении сорта молока? Какое значение имеет худший показатель?

2. На чем основана постановка редуктажной пробы молока?

3. Суть методики при определении эффективности пастеризации.

4. Какие исследования проводят при определении коли-титра молока?

5. Какие питательные среды применяются при этом?

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

**Цель занятия.** Овладеть методами бактериологического контроля технологического процесса производства продуктов молочнокислого брожения.

**Материалы и оборудование.** Набор продуктов молочнокислого брожения для изучения микрофлоры: катык, кефир, кумыс, ацидофилин, сметана. Лучше заранее попросить студентов принести с собой на занятия любимые кисломолочные продукты. Спиртовки, метиленовая синь для простого метода окрашивания, микроскопы, иммерсионное масло, бактериологические петли.

Общим признаком всех кисломолочных продуктов является молочнокислое брожение, вызванное молочнокислыми бактериями. Микроорганизмы выделяют фермент лактазу, расщепляющую дисахарид лактозу на две молекулы моносахаридов: глюкозу и галактозу.

Таким образом, из одной молекулы сахара лактозы образуются четыре молекулы молочной кислоты. В молоке повышается кислотность, содержащийся в нем казеин свертывается и образует сгусток.

В некоторых кисломолочных продуктах наряду с молочнокислым брожением протекает и спиртовое брожение. В связи с этим различают следующие виды продуктов:

- 1) продукты молочнокислого брожения: сметана, простокваша, ацидофильное молоко;
- 2) продукты смешанного (молчнокислого и спиртового) брожения: кумыс, кефир, катык и др.

## 22.1. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

При приеме молоко подвергается органолептической оценке, физико-химическим исследованиям, очистке, а также нормализации по содержанию жира — 1%, 3,2%, 4% и т. д. Затем молоко пастеризуют по обычной технологии и охлаждают на охладителях до оптимальной температуры заквашивания, которая зависит от вида микроорганизмов, применяемых в качестве закваски:

- для мезофильных микроорганизмов — 25–35°C;
- для термофильных микроорганизмов — 40–44°C.

После этого вносят 3–10% молочнокислой закваски, тщательно перемешивают и выдерживают при такой температуре 4–8 ч. В процессе сквашивания происходят сложные микробиологические и физико-химические процессы, в результате которых формируются сгусток, специфический вкус, запах, консистенция и внешний вид готового продукта.

Кисломолочные продукты можно готовить *термостатным* и *резервуарным* способами, последовательность технологических процессов которых отличаются.

**При термостатном способе** молоко, после внесения и распределения закваски во всей массе молока, сразу же разливают в потребительскую тару и в этой таре помещают в термостат для сквашивания. После образования сгустка через 6–8 ч его направляют в холодильные камеры при 4–6°C и выдерживают для созревания 12–18 ч.

**При резервуарном способе** после внесения закваски в молоко процесс сквашивания, созревания и охлаждения продукта проводят в одних и тех же резервуарах большой емкости, получившийся сгусток разбивается, продукт приобретает жидкую консистенцию и его расфасовывают в потребительскую тару. Этот способ позволяет снизить себестоимость продукции в 1,5 раза и на 35% повысить производительность труда.

Для получения кисломолочного продукта желательной консистенции с выраженным вкусом и ароматом на молочном комбинате должны быть хорошие закваски. Обычно их получают из производственных лабораторий, научно-исследовательских институтов в виде лиофильно высушенных или жидких культур молочнокислых бактерий во флаконах с этикеткой:

- «закваска бактериальная» из термофильных молочнокислых стрептококков;
- «концентрат бактериальный» из мезофильных лактококков и т. д.

Каждая культура молочнокислых бактерий имеет паспорт, в котором указаны их морфологические и тинкториальные свойства, температурный оптимум, способность ферментировать молочную кислоту до 110°Т или 300°Т в продукте, способность образовывать ароматические соединения. В производстве чаще применяются следующие виды:

1) молочнокислый стрептококк — *Streptococcus lactis*, *Str. thermophilus*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*;

2) молочнокислые палочки — *Lactobacterium bulgaricum*, *L. acidophilus*.

Для каждого кисломолочного продукта применяется своя специфическая закваска. Отличие между ними заключается в том, что в каждой закваске находится один или сочетание нескольких видов молочнокислых микроорганизмов, которые, развиваясь в продукте, придают ему нужные, характерные свойства.

Чистоту закваски, а также соотношение между ее компонентами, проверяют ежедневно путем приготовления окрашенных препаратов и их микроскопией под иммерсионным объективом.

## 22.2. ПРОДУКТЫ МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ

### 22.2.1. Ацидофильное молоко

Ацидофильное молоко относится к продуктам молочнокислого брожения, для приготовления которого применяется ацидофильная палочка. Ацидофильная палочка, в отличие от других молочнокислых бактерий, хорошо приживается в желудочно-кишечном тракте. Это объясняется тем, что ацидофильные бактерии относятся к постоянным обитателям желудочно-кишечного тракта молодняка, детей, находящихся на молочном вскармливании. При переходе на смешанное кормление ацидофильная палочка заменяется другими микроорганизмами. Ацидофильная палочка образует больше молочной кислоты, антибиотических веществ, чем другие молочнокислые бактерии, которые губительно действуют на гнилостные и болезнетворные виды бактерий. Поэтому рекомендуют использовать ацидофильные препараты для профилактики и лечения болезней желудочно-кишечного тракта, при дисбактериозе, а также для ускорения восстановления полезной микрофлоры кишечника после приема антибиотиков.

#### **Технология приготовления ацидофильного молока.**

Для приготовления этого продукта в пастеризованное и охлажденное до 42–44°C молоко вносят 3% закваски, содержащей чистую культуру *L. acidophilum*, перемешивают и ставят в термостат при 42°C, сгусток образуется через 6–8 ч — он должен иметь однородную, тягучую консистенцию. Для контроля чистоты закваски из готового продукта бактериологической петлей берут каплю и наносят на предметное стекло, готовят мазок, окрашивают метиленовой синью. При микроскопии препаратов из ацидофильного молока в поле зрения обнаруживаются крупные палочки, расположенные одиночно или в виде коротких цепочек.

### 22.2.2. Технология приготовления сметаны

В пастеризованные и охлажденные до 30°C сливки вносят 3% закваски, состоящей из чистой культуры *Str. lactis* или *Str. cremoris*. Заквашивание происходит через 8–10 ч. Для контроля качества приготовленной сметаны из нее готовят препарат, распределяя массу тонким слоем на подогретом в пламени горелки предметном стекле. Мазок сушат на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфира и окрашивают метиленовой синью 5 мин. При микроскопии свежей сметаны должны быть видны кокки, соединенные попарно или в виде коротких цепочек.

Если сметана несвежая, в поле зрения встречаются клетки дрожжей, молочной плесени — *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), споровых палочек.

### 22.2.3. Технология приготовления домашней простокваши

В процессе дойки в молоко попадают бактерии из соскового канала, молочной посуды, рук доярки и т. д. Хозяйка, желающая приготовить простоквашу в домашних условиях, ставит сырое молоко в теплое место и в нем последовательно проходят все известные фазы — от бактерицидной до молочнокислой, в результате в нем накапливается молочная кислота и образуется сгусток. После этого простоквашу ставят в холодное место для созревания. При микроскопии препаратов, приготовленных из свежей простокваши, преобладают молочнокислые стрептококки, а затем появляются и молочнокислые палочки, — в таком продукте «работают» дикие штаммы молочнокислых бактерий. В производственных условиях для приготовления простокваши применяют только чистые культуры молочнокислых бактерий.

## 22.3. ПРОДУКТЫ КОМБИНИРОВАННОГО БРОЖЕНИЯ

### 22.3.1. Технология приготовления кефира

Кефир относится к кисломолочным продуктам смешанного брожения, для приготовления которого применяются кефирные грибки. Внешне кефирный грибок похож на округлые упругие комочки творога диаметром от 0,5 до 3 см. В благоприятных условиях они активно делятся, увеличиваются в массе, ими можно пользоваться в домашних условиях, излишки раздавать соседям и знакомым. Но они требуют ухода, особой чистоты, так как в антисанитарных условиях покрываются плесенью и слизью, издадут неприятный запах. Кефирные грибки имеют определенную структуру и ведут себя как живой саморегулирующийся организм: растут, размножаются и обладают наследственностью.

При гистологическом исследовании срезов видны переплетения нитей, которые образуют стromу грибка, удерживающую остальную группу микроорганизмов состоящую из:

- 1) мезофильных молочнокислых стрептококков (*Str. lactis*);
- 2) мезофильных молочнокислых палочек (*Beta- и Streptobacterium*);
- 3) термофильных молочнокислых палочек (*L. casei*);
- 4) молочных дрожжей, прочно связанных со стromой гриба.

Все микроорганизмы, входящие в состав грибка, находятся между собой в симбиотических отношениях: молочнокислые бактерии, гидролизуют лактозу, снабжают молочные дрожжи молочной кислотой, необходимой им для жизнедеятельности, а дрожжи выделяют необходимые бактериям аминокислоты, вызывают спиртовое брожение, насыщают продукт углекислотой, что придает кефиру особый вкус.

**Методика приготовления грибковой кефирной закваски.** В пастеризованное и охлажденное до 20°C молоко

вносят 5% кефирных зерен, заквашивание происходит в течение 12–14 ч. Затем грибковую закваску процеживают через сито и используют как производственную закваску для приготовления потребительского кефира.

Качество закваски регулярно проверяют, определяют активность (скорость сквашивания, кислотность), органолептические качества, наличие посторонней микрофлоры путем просмотра под микроскопом 10 полей зрения в препарате, приготовленном из кефира.

При микроскопии препаратов из кефира в поле зрения микроскопа преобладают молочнокислые стрептококки, чаще в виде парно расположенных кокков и коротких цепочек, видны одиночные палочки и семейки дрожжей различной численности. При внимательном просмотре препарата можно обнаружить почкующиеся дрожжи. Количество дрожжей заметно увеличивается по мере старения продукта.

### 22.3.2. Технология приготовления кумыса

Кумыс готовят из кобыльего молока, которое сильно отличается от коровьего по химическому составу (жира только 1,5–2%, сахара — до 6% и высокое содержание альбумина, а у коров большое количество казеина).

В молоке кобылиц преобладает альбумин, который при воздействии молочной кислоты образует рыхлый осадок, неплотный сгусток с мелкими хлопьями, благодаря этому сквашенное кобылье молоко остается однородным, без осадка.

При получении кобыльего молока необходимо строго соблюдать все санитарно-гигиенические требования, так как кобылье молоко нельзя пастеризовать. При пастеризации оно свертывается, поэтому закваску вносят в парное молоко.

**Методика приготовления кумыса.** В парное молоко вносят закваску, состоящую из болгарских молочнокислых палочек и дрожжей рода *Torula* — оптимальная температура сквашивания 26°C (при высокой темпера-

туре происходит молочнокислое брожение, при низкой — спиртовое), сквашивание происходит за 6–8 ч.

Для созревания кумыс ставят в прохладное место при 6°C на 24–48 ч. Кумыс, как и кефир, является продуктом смешанного брожения. В результате большого содержания молочного сахара деятельность дрожжей активизируется и количество спирта у зрелого кумыса доходит до 2,5%.

При микроскопии препаратов, приготовленных из кумыса, видны крупные клетки дрожжей и молочнокислых палочек.

При получении кумыса в домашних условиях в качестве закваски применяют кумыс прежней выработки.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести органолептическое исследование простокваши, ацидофилина, кефира, катыка.
2. Приготовить препараты из перечисленных продуктов, окрасить метиленовой синью, провести микроскопию под иммерсией.
3. Изучить микрофлору различных кисломолочных продуктов, микрокартину зарисовать.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. На чем основано приготовление кисломолочных продуктов?
2. Перечислите этапы технологического процесса при приготовлении кисломолочных продуктов.
3. Дайте характеристику продуктов молочнокислого брожения.
4. Дайте характеристику продуктов комбинированного молочнокислого брожения.
5. Чем характеризуется резервуарный и термостатный метод приготовления кисломолочных продуктов?

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА СЛИВОЧНОГО МАСЛА**

**Цель занятия.** Овладеть методами бактериологического контроля производства сливочного масла. Научиться дифференцировать качество свежего и несвежего сливочного масла по микрокартине под микроскопом.

**Материалы и оборудование.** Образцы свежего и несвежего сливочного масла в чашках Петри, водяная баня, банки с притертыми пробками, стерильные пипетки, центрифуги, лупы; набор красок по Граму, метиленовый синий; фильтровальная бумага, спиртовки; микроскопы и все необходимое для микроскопии. Пробирки с 9 мл стерильной воды для разведения масла, градуированные стерильные пипетки, питательные среды в пробирках высоким столбиком в водяной бане:

- для учета общего количества бактерий или МАФАНМ — МПА высоким столбиком;
- для учета протеолитических бактерий — пробирки с молочным агаром столбиком;
- для учета молочнокислых бактерий — МПА с гидролизованым обратом и мелом в пробирках столбиком;
- для учета дрожжей — пробирки с сусло-агаром и стрептомицином;
- для учета бродильного титра — среда Кесслера.

Различают два основных типа сливочного масла: сладкосливочное и кислосливочное.

*Сладкосливочное масло* готовят из пастеризованных сливок, в которые не вносят закваску из молочнокислых бактерий. В технологии приготовления масла этого типа микрофлора нежелательна: чем меньше микроорганизмов, тем лучше масло. Понижения численности микрофлоры масла достигают пастеризацией сливок, хранением готового масла при очень низких температурах ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) и тщательном уходе за оборудованием в течение технологического процесса. Загрязнение масла возможно из-за применения недоброкачественной воды, используемой для его промывания, с рук персонала, с поверхности оборудования, из воздуха. В 1 мл свежего сладкосливочного масла может содержаться до 10 000–100 000 клеток бактерий.

Технология приготовления *кислосливочного масла* основана на использовании молочнокислых бактерий для сквашивания сливок. После пастеризации и охлаждения до  $30^{\circ}\text{C}$  в сливки вносят 0,5–3% закваски, состав микрофлоры которой важен для повышения устойчивости при хранении и придания маслу специфического аромата. В состав закваски входят *Streptococcus lactis*, *Str. cremoris* и ароматобразующие бактерии: *Str. diacetylactis*, *Str. citrovorus* и *Str. paracitrovorus*. В 1 г кислосливочного масла содержится от 1 до 10 млн молочнокислых бактерий, поэтому определение общего количества бактерий или МАФАНМ в кислосливочном масле не проводят.

Для микробиологического исследования масла стерильным щупом берут пробы из трех мест на расстоянии 5 см от края тары. Из щупа стерильным шпателем берут образцы масла массой около 15–20 г и помещают в стерильные банки с притертыми пробками.

При исследовании на наличие плесневых грибов с поверхности масла делают соскобы, особенно с тех мест, где невооруженным глазом или в лупу виден мицелий гриба, часто окрашенный в черный, зеленый цвет.

Перед исследованием пробу масла расплавляют в банке на водяной бане, нагретой до  $40-50^{\circ}\text{C}$ . Из расплавленного масла после тщательного перемешивания стерильной пи-

петкой берут 1 мл и вносят в пробирку с 9 мл стерильной подогретой до 40–50°C воды. Из полученного таким образом разведения  $10^{-1}$  готовят все последующие:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$ . Из соответствующих разведений делают посев по 1 мл на простые и элективные среды:

- для учета общего количества бактерий (МАФАНМ) — на МПА;
- для учета протеолитических бактерий — на молочный агар;
- для учета молочнокислых бактерий — на агар с гидролизованным обратом и мелом;
- для учета дрожжей — на сусло-агар со стрептомицином;
- для определения бродильного титра — на среду Кесслера.

*Для микроскопического исследования* берут образцы свежего и несвежего масла. Плавают в стеклянном стакане на водяной бане при температуре 50°C, перемешивают, наливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Верхний масляный слой сливают, а из осадка готовят препарат на предметном стекле. Мазок подсушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и обезжиривают, прикладывая к расплавленному маслу фильтровальную бумагу. Лучше фиксировать в смеси спирта с эфиром, так как при этом эфир хорошо обезжиривает препарат. Окрашивают по Граму или метиленовым синим в течение 5 мин и микро копируют под иммерсионным объективом.

**Микрокартина.** В свежем кисломолочном масле находятся только молочнокислые стрептококки, в несвежем — наряду с молочнокислыми бактериями встречаются дрожжи, плесневые грибы, флуоресцирующие и гниlostные бактерии.

### **Учет общего количества бактерий (МАФАНМ)**

Для учета общего количества бактерий (МАФАНМ) в сладкомолочном масле делают посев по 1 мл расплавленного масла градуированной пипеткой из разведений

$10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  в стерильные чашки Петри (в двух повторях), которые заливают расплавленным и охлажденным до  $50^{\circ}\text{C}$  МПА, тщательно перемешивают. Чашки с посевами ставят в термостат на 24–48 ч при  $30^{\circ}\text{C}$ , с последующим подсчетом числа выросших колоний и расчетом количества бактерий в 1 г масла.

### **Учет количества протеолитических бактерий**

Для этого делают посев по 1 мл расплавленного масла градуированной пипеткой из разведений:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  сладкосливочного масла и из  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  кислосливочного масла в чашки Петри, которые заливают расплавленным и охлажденным до  $50^{\circ}\text{C}$  молочным агаром, тщательно перемешивают. Чашки с посевами ставят в термостат на 24–48 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , с последующим подсчетом числа выросших колоний и определением количества протеолитических бактерий в 1 г масла.

### **Учет количества молочнокислых бактерий**

Для этого делают посев по 1 мл расплавленного масла градуированной пипеткой из разведений:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  в чашки Петри и заливают расплавленным и охлажденным до  $50^{\circ}\text{C}$  агаром с гидролизованным обратом и мелом, тщательно перемешивают. Чашки с посевами ставят в термостат на 24–48 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , с последующим подсчетом количества выросших колоний и определением количества протеолитических бактерий в 1 г масла.

### **Учет количества микроскопических грибов и дрожжей**

Для этого делают посев 1 мл масла из разведений  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  в чашки Петри и заливают расплавленным суслоагаром со стрептомицином (стрептомицин ингибирует развитие сопутствующей бактериальной флоры). Посе-

вы культивируют при 28°C в течение 3–7 дней, количество характерных колоний подсчитывают.

### **Определение бродильного титра**

Для этого делают посев 1 г натурального масла и по 1 мл расплавленного масла из разведений  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  одновременно в две параллельные пробирки со средой Кесслера. Посевы культивируют 24 ч при 37°C, учитывают те разведения, в которых появилось помутнение среды и пузырек газа в поплавках (после посева 1 г натурального масла изменений в среде Кесслера не должно быть).

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести микроскопическое исследование свежего и несвежего сливочного масла.
2. Провести посев сливочного масла для определения количества МАФАНМ.
3. Провести посев сливочного масла для определения количества молочнокислых бактерий.
4. Провести посев сливочного масла в среду Кесслера для определения бродильного титра.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Как проводят отбор проб масла и подготавливают его для микроскопического и бактериологического исследований?
2. Как называется метод определения количества МАФАНМ в исследуемом продукте?
3. Какие питательные среды применяют для определения количества протеолитических, молочнокислых бактерий, БГКП и наличия плесневых грибов и дрожжей?

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА СЫРА

**Цель занятия.** Овладеть методами органолептического и микробиологического контроля качества сыра. Научиться дифференцировать твердые и мягкие сыры по микрокартине под микроскопом.

**Материалы и оборудование.** Свежий сыр типа голландского, скальпель, предметные стекла, краска метиленовая синь, набор красок по Граму, спиртовки, микроскопы, иммерсионное масло. Пробирки с 9 мл стерильной воды для разведений сыра, стерильные пипетки, плотные питательные среды в пробирках высоким столбиком в горячей водяной бане. Для бактериологического исследования:

- для учета общего количества бактерий (МАФАНМ) — МПА высоким столбиком;
- для учета протеолитических бактерий — пробирки с молочным агаром столбиком;
- для определения количества дрожжей — среда Сабуро;
- для определения бродильного титра — пробирки со средой Кесслера;
- для определения количества маслянокислых бактерий — стерильное молоко.

В основе сыроделия лежат сложные биохимические процессы, основная роль в них принадлежит молочнокислому и пропионовокислому брожению. Большое влияние

на качество готового продукта оказывает качество молока, и прежде всего степень обсемененности его нежелательными микроорганизмами.

Различают два вида сыров: *кисломолочные* — в созревании которых участвуют только молочнокислые бактерии, и *сычужные* — в созревании которых принимают совместное участие молочнокислые бактерии и сычужный фермент. Свертывание молока (коагуляцию казеина) проводят, заквашивая его молочнокислыми бактериями и вводя сычужный фермент.

По степени разложения казеина сычужные сыры делят на твердые и мягкие. В твердых сырах одна треть казеина переходит в растворимое состояние, в мягких — почти весь. Твердые сыры, в свою очередь, делят на крупные (швейцарский, российский) и мелкие (голландский, костромской).

Крупные сыры имеют более длительный период созревания (6–9 мес.), а мелкие — 1–2 мес., в процессе их приготовления участвуют преимущественно молочнокислые палочки *Lactobacillus casei*, *L. helveticus*, в меньшей степени молочнокислые стрептококки *Streptococcus lactis* и ароматообразующие стрептококки.

В закваску для крупных сыров наряду с молочнокислыми бактериями включают и пропионовокислые палочки. Стадия пропионовокислого брожения следует за стадией молочнокислого брожения и сопровождается накоплением летучих кислот (пропионовой, уксусной) и диоксида углерода, образующихся при сбраживании лактатов. Выделение диоксида углерода обуславливает появление рисунка сыра — так называемых глазков.

В мелких сырах глазки образуются в первые дни ферментации в результате жизнедеятельности ароматообразующих стрептококков, когда в сыре еще содержится несброженная лактоза. Свойства сыра — вкус, аромат, консистенция, рисунок — формируются при сложных биохимических процессах, главная роль в которых принадлежит микроорганизмам, внесенным в сырную массу с закваской.

Наличие посторонних микроорганизмов в сыре может служить причиной различных его пороков. Раннее вспучивание сыров вследствие образования большого количества газов ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ ) вызывают бактерии группы кишечной палочки в период, когда в сыре еще не вся лактоза израсходована. Позднее вспучивание вызывают маслянокислые бактерии рода *Clostridium*, сбраживающие молочную кислоту в масляную с выделением  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ . Изъязвление корки сыра могут вызывать плесневые грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*).

**Микроскопическое исследование.** Для исследования берут свежий сыр. Сначала фламбированным ножом с соблюдением правил асептики срезают слой сыра с того места, где будет взята проба. Затем на этом месте срезают тонкий кусочек сыра и плотно сдавливают его между двумя сухими чистыми предметными стеклами. Стекла разъединяют, полученный на стекле отпечаток сушат на воздухе, фиксируют смесью спирта с эфиром и окрашивают метиленовой синью. При микроскопии крупных сыров выявляются палочковидные формы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, при микроскопии мелких сыров — молочнокислые стрептококки.

**Бактериологическое исследование сыра.** Пробы сыра берут с соблюдением правил асептики стерильным щупом, который вводят в середину куска, предварительно прижигая раскаленным шпателем выбранный участок поверхности. Из щупа берут 10 г сыра, 1 г сыра измельчают в фарфоровой ступке и растирают в 9 мл стерильной, подогретой до  $45^\circ\text{C}$  воды, из этого разведения готовят все последующие.

**Определение бродильного титра.** Для определения бродильного титра делают посев по 1 мл из разведений сыра  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  одновременно в две параллельные пробирки со средой Кесслера.

**Определение наличия маслянокислых бактерий.** Присутствие маслянокислых бактерий в сыре является причиной выделения большого количества газа ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ ), а выделяемая ими масляная кислота придает сыру прогорклый вкус. Для определения наличия масляно-

кислых бактерий в сыре делают посев по 1 мл из разведений  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  параллельно в две пробирки со стерильным молоком. После посева пробирки прогревают в водяной бане до  $90^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин для уничтожения вегетативных клеток, затем культивируют в термостате при  $30^{\circ}\text{C}$  в течение 3 сут. Количество маслянокислых бактерий устанавливают методом предельных разведений с учетом наличия в посевах газа, запаха масляной кислоты, обнаружения в мазках спорных форм бактерий, имеющих вид веретена, и положительной реакцией на гранулезу.

**Количество дрожжей** определяют посевом по 1 мл из разведений сыра  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  на среду Сабуро или сусло-агар.

**Количество маммококков**, вызывающих пептонизацию казеина и образование горьких пептидов, определяют посевом 1 мл из разведений сыра  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  на молочный агар.

Количественные соотношения между молочнокислыми стрептококками и палочками определяют посевом 1 мл из разведений  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  одновременно в две пробирки со стерильным обезжиренным молоком.

В 0,1 г зрелого сыра не должна содержаться кишечная палочка, количество спор маслянокислых бактерий не должно быть более 100 в 1 г продукта.

## **ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ**

1. Провести органолептическую оценку образцов сыра.

2. Приготовить препараты-отпечатки из исследуемых образцов сыра.

3. Окрасить простым методом приготовленные препараты и изучить микрофлору твердых и мягких сыров. Обратит внимание на морфологию найденных микроорганизмов.

4. Приготовить с соблюдением правил асептики разведения сыра и сделать посев с целью определения бродильного титра для определения количества дрожжей и плесневых грибов.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Чем отличается закваска для приготовления твердых сыров от закваски для мелких сыров?
2. Какие микроорганизмы вызывают раннее вспучивание сыров?
3. Какие микроорганизмы вызывают позднее вспучивание сыров?
4. Какие микроорганизмы вызывают изъязвление корки сыра?
5. Чем отличается микрокартина в препаратах-отпечатках от крупных сыров от микрокартины, полученной в препаратах-отпечатках из мелких сыров?

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ДРОЖЖЕВОЙ ЗАКВАСКИ

**Цель занятия.** Овладеть методами микроскопического и бактериологического контроля качества дрожжевой закваски.

**Материалы и оборудование.** Пробирки со взвесью дрожжей разного возраста. Чашки Петри с сусло-агаром с мелом, набор красок по Граму, метиленовая синь по Леффлеру, раствор Люголя. Микроскопы, предметные и покровные стекла, пипетки, иммерсионное масло.

Дрожжи — представители класса *Ascomycetes*, являются одноклеточными организмами, широко распространенными в природе. Они встречаются на поверхности листьев, фруктов и овощей, в кормах, почве, разнообразных субстратах, продуктах, богатых легкосбраживаемыми углеводами.

## 25.1. МОРФОЛОГИЯ

Дрожжи имеют разнообразную форму — округлые, яйцевидные, реже цилиндрические, каждая клетка при этом существует совершенно обособленно. Форма клеток может изменяться от условий внешней среды и возраста

популяции. Величина дрожжевой клетки обычно колеблется в пределах 6–15 мкм.

Дрожжи относятся к эукариотным организмам, у них имеется клеточная стенка, истинное ядро, ограниченное от цитоплазмы двуслойной мембраной, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи, лизосомы, митохондрии, рибосомы, вакуоли. В состав клеточной стенки дрожжей входят гемицеллюлоза (до 60–70% сухой массы), небольшое количество белка, липиды и хитин.

При обычной микроскопии и специальных методах окрашивания в цитоплазме можно обнаружить капли жира, гранулы волютина и гликогена, по наличию которых можно судить о возрасте культуры. У стареющих дрожжевых клеток появляются вакуоли.

Определение количества дрожжевых клеток в закваске проводится с применением камеры Горяева. В 1 мл дрожжевой закваски должно быть 120–140 млн клеток. В процессе жизнедеятельности дрожжи накапливают запасные питательные вещества, которые можно выявить специальными методами окрашивания. Например, *гликоген*, который откладывается как запасной материал и расходуется клеткой по мере ее старения. Наряду с гликогеном в цитоплазме откладывается *волютин* или метахроматин, наличие которых также можно установить.

**Определение возраста дрожжей.** Молодые дрожжи имеют тонкую оболочку, гомогенную цитоплазму, вакуоли только намечаются. Дрожжи активно размножаются, число почкующихся клеток достигает 70–80%.

В культуре зрелых дрожжей процесс размножения замедляется, количество почкующихся клеток составляет не более 10–15%, увеличивается число мертвых клеток. Оболочка мертвой дрожжевой клетки утолщена, ее видно при микроскопии, в цитоплазме появляется зернистость, увеличивается количество вакуолей.

### **25.1.1. Определение числа клеток, содержащих гликоген**

Полисахариды в клетках дрожжей представлены гликогеном, имеющим вид гранул, расположенных в цитоплазме, выявляют их при обработке клеток раствором Люголя. Зрелость дрожжей определяется по накоплению гликогена в цитоплазме.

**Методика.** Каплю взвеси изучаемой дрожжевой закваски наносят на предметное стекло и добавляют в нее каплю раствора Люголя. Каплю накрывают покровным стеклом — получается «раздавленная капля», ее микрофотографируют и изучают при увеличении в 400 раз.

**Микрокартина.** Гликогенподобные полисахариды окрашиваются раствором Люголя в красновато-бурый цвет, а крахмалоподобное вещество (гранулеза) окрашивается в синий. Реакция на гликоген идет только в кислой среде, поэтому перед выявлением его в клетке среду, где выращивали дрожжи, подкисляют. При микроскопии препаратов вначале изучают микрокартину под 40-кратным объективом, а затем с применением 90-кратного.

Количество дрожжевых клеток с гликогеном должно составлять не менее 70% от общего числа. Меньшее количество клеток с гликогеном свидетельствует о старости культуры. Отсутствие гликогена свидетельствует о том, что дрожжи незрелые и их нельзя применять в качестве закваски, так как процесс брожения будет замедлен. Такую закваску из дрожжей перед применением следует подкормить, т. е. добавить свежую питательную среду, чтобы количество клеток с гликогеном увеличилось.

### **25.1.2. Выявление волютиновых гранул в клетках дрожжей**

Дрожжи в определенных условиях при избытке питательных веществ накапливают запасные вещества различной природы. Полифосфаты в клетках дрожжей представлены волютином, они накапливаются перед

почкованием, их наличие изучают для определения возраста. Полифосфаты, которые локализируются в цитоплазме дрожжевой клетки, часто называют волютиновыми или метахроматиновыми гранулами.

Окраска волютиновых гранул основана на свойстве метахромазии — способности вызывать изменение цвета некоторых красителей.

### **Методика окраски дрожжей с целью выявления волютина**

1. Приготовить мазок из взвеси исследуемых дрожжей, высушить и зафиксировать в пламени спиртовки.

2. Нанести на мазок метиленовую синь по Леффлеру на 5 мин.

3. Смыть водой краску и, не высушивая, нанести каплю 1% -ного раствора  $H_2SO_4$ .

4. Мазок-каплю прикрыть покровным стеклом и изучить под иммерсионной системой.

**Микрокартина:** цитоплазма клетки бледно-голубого цвета, а волютиновые гранулы окрашены в сине-фиолетовый цвет.

## **25.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПОСТОРОННЕЙ МИКРОФЛОРЫ**

### **25.2.1. Микроскопические методы**

Из дрожжевой закваски готовят препарат на предметном стекле, окрашивают по Граму или простым методом, микрокопируют под иммерсионным объективом.

При микроскопии такого препарата под увеличением в 900 раз в поле зрения видны крупные клетки дрожжей, а в просветах между ними — посторонние бактерии, обращают внимание на их морфологию.

Для более детального изучения бактериального загрязнения можно сделать посев на поверхность питательных сред в чашках Петри, этот метод позволяет ориентировочно определить родовую принадлежность посторонней микрофлоры и определить источник загрязнения.

### 25.2.2. Бактериологические методы

**Методика.** С соблюдением правил асептики 1 г пресованных дрожжей вносят в 9 мл стерильной воды и готовят ряд последовательных разведений 1:10 и 1:100 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). Из последнего разведения две капли взвеси вносят на поверхность сусло-агара с мелом в первую чашку Петри и равномерно распределяют стерильным шпателем. Этим же шпателем остаток материала распределяют на поверхности второй чашки Петри. Обе чашки помещают в термостат при температуре 30°C на 48 ч, после чего подсчитывают количество колоний.

Для определения качественного состава микроорганизмов берут ту чашку, в которой выросло не более 60 изолированных колоний. Отдельно подсчитывают колонии сахаромицетов, входящих в состав закваски, а также посторонних дрожжей и вычисляют их процентное соотношение.

Истинные сахаромицеты образуют белые или желтоватые колонии, с гладкой поверхностью и ровными краями. Колонии посторонних дрожжей разнообразные по форме и цвету. Например, колонии некоторых видов рода *Candida* образуют матовые, белые, плоские, слизистые, иногда морщинистые, быстро растущие колонии; для колоний дрожжей рода *Torula* характерны серые слизистые колонии.

Для выявления молочнокислых (кислотообразующих) бактерий в дрожжевой закваске делают посев на сусло-агар с мелом. На этом агаре молочнокислые бактерии образуют полупрозрачные, круглые колонии разного диаметра (0,5–2 мм), слегка опалесцирующие, с зоной просветления вокруг них.

Наличие *Bac. subtilis* проверяют по следующей методике: пробирку с 2 мл взвеси дрожжей (из разведения 1:10) помещают на 20 мин в кипящую водяную баню для уничтожения вегетативных клеток, затем прибавляют 5 мл стерильного солодового сусла и помещают в термостат на 1–2 сут. При наличии сенной палочки в дрожжевой закваске на поверхности жидкой среды появляется типичная пленка, которую исследуют под микроскопом. При посеве загрязненной дрожжевой закваски на МПА в чашки Петри на поверхности агара появляются сухие морщинистые колонии диаметром до 2–3 см или слизистые колонии диаметром 3–10 мм с неровными краями.

Наличие бактерий *Proteus vulgaris* определяют посевом дрожжевой закваски в объеме бактериальной петли в конденсационную воду косога агара в пробирке. В случае загрязнения дрожжей этими бактериями через 24 ч появляются полупрозрачные ползущие вверх колонии.

Годными считаются такие закваски, в которых количество посторонних бактерий составляет меньше 1% по отношению к числу дрожжевых клеток.

### **Определение количества мертвых клеток в дрожжевой закваске под микроскопом в препарате «раздавленная капля»**

**Методика.** На предметное стекло нанести каплю взвеси дрожжей и две капли раствора метиленовой сини, накрыть покровным выдержать 5 мин. Подсчитать количество всех дрожжевых клеток в пяти полях зрения и отдельно количество окрашенных. Живые дрожжевые клетки не окрашиваются, а *мертвые клетки* хорошо прокрашиваются в синий цвет, так как метиленовая синь диффундирует только через мембрану мертвых клеток. В культуре зрелых дрожжей количество мертвых клеток должно быть не более 2–4%, их наличие замедляет специфическое брожение, продукты распада придают конечному продукту неприятный запах и привкус.

### 25.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЪЕМНОЙ СИЛЫ ДРОЖЖЕЙ

В мерный стакан на 100 мл вносят 3,2 г прессованных дрожжей и немного воды. Стеклопалочкой дрожжи хорошо растирают до исчезновения комков, затем доливают до метки воду (температура 30°C) и вновь хорошо размешивают. В фарфоровую чашку переносят 5 мл полученной дрожжевой суспензии, прибавляют 8 г пшеничной муки второго сорта и замешивают тесто, придав ему форму шарика. Приготовление теста и шарика следует делать быстро, не более 4 мин. Свежеприготовленный шарик помещают в стакан с 200 мл воды, имеющей температуру 30°C, при этом шарик опускается на дно. Стакан с шариком ставят в водяную баню и поддерживают температуру 30°C. Далее надо следить за поведением шарика: отмечают время, прошедшее с момента погружения шарика на дно стакана, до момента подъема его на поверхность воды — это явление происходит благодаря активной ферментативной деятельности хороших дрожжей, так как тесто разрыхляется пузырьками  $\text{CO}_2$ . Наилучший показатель подъемной силы — 10–15 мин, хороший — 15–20 мин.

### ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Определить возраст дрожжей в дрожжевой закваске.
2. Определить наличие бактериального загрязнения дрожжевой закваски.
3. Выявить гликоген в клетках дрожжей.
4. Выявить волютиновые гранулы в клетках дрожжей.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите морфологию дрожжей.
2. С какой целью определяют возраст дрожжей?
3. С какой целью определяют наличие гликогена в дрожжевой клетке?
4. С какой целью определяют количество мертвых клеток в дрожжевой закваске?
5. Какими методами определяют в дрожжевой закваске наличие сенной палочки, вульгарного протея, молочнокислых бактерий?

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПЕРЕРАБОТКИ ЗЕРНА, МУКИ И ХЛЕБНЫХ ПРОДУКТОВ

**Цель занятия.** Овладеть микробиологическими и микологическими методами исследования зерна, муки различных образцов.

**Материалы и оборудование.** Зерно, мука различных образцов, хлеб со следами плесневого поражения. Чашки Петри, пипетки на 1 и 5 мл, пробирки с 9 мл стерильного физраствора, горячий МПА столбиком, чашки со средами Сабуро, Чапека.

Зерно, находящееся в колосе, уже содержит значительное количество микроорганизмов. По мере созревания зерна количество микроорганизмов возрастает, в 1 г зрелого зерна содержатся десятки тысяч микроорганизмов. Во время уборки урожая и при обмолоте снопов зерно загрязняется микробами, попадающими на него с пылью и частицами почвы. В зерне широко представлены споровые аэробные бактерии (*Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. mycoides* и др.), палочки протея, кишечная палочка, молочнокислые, маслянокислые бактерии и различные плесневые грибы (*Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Oidium*).

При хранении зерна, особенно если оно влажное, количество микробов может быстро возрасти. Вначале размножаются кокковые формы, позднее начинают преобладать разные споровые и бесспорные палочки.

Даже кратковременное размножение микроорганизмов сказывается на качестве зерна: на нем появляются пятна, оно темнеет и приобретает затхлый запах. Сушка зерна несколько снижает количество микробов в нем, так как в результате снижения влажности создаются неблагоприятные условия для их размножения.

Зерно перед переработкой необходимо очистить от примесей и загрязнения. Перед размолом зерно просеивают, продувают и лущат на машинах, сбивающих с зерен грязь, оболочки и частично зародыши. Хорошая очистка значительно снижает (в 2 раза и более) количество микроорганизмов в зерне.

## 26.1. МИКРОФЛОРА МУКИ

При помолу зерна микробы с поверхности зерна частично переходят в муку. В крупу, так же как в муку, переходит большее или меньшее число микробов в зависимости от способа очистки и обработки зерна. При благоприятных условиях температуры и влажности оставшиеся в муке и крупе микроорганизмы могут развиваться и вызывать порчу продукта.

Прокисание муки связано с микробным разложением сахаров, образующихся при осахаривании крахмала.

Плесневение муки — распространенная форма порчи при повышенной влажности, при этом появляется запах плесени и затхлости.

Микробиологические процессы в тесте вызываются двумя видами микроорганизмов, входящих в закваску: дрожжами и молочнокислыми бактериями.

Дрожжи являются возбудителями спиртового брожения, превращение углеводов в спирт сопровождается обильным выделением углекислоты и побочных продук-

тов, придающих хлебу специфический вкус и аромат, выгодно отличающий его от хлеба, разрыхленного химическим способом (при помощи пекарских порошков, например углекислого аммония, распадающегося при выпечке с образованием  $\text{CO}_2$ ).

Молочнокислые микроорганизмы расщепляют углеводы до молочной кислоты и некоторых летучих кислот, в частности уксусной. Накопление кислоты в пшеничном тесте сравнительно невелико, в ржаном оно значительно.

Ржаное тесто замешивают с применением закваски, содержащей, кроме дрожжей, и молочнокислые бактерии. Оптимальная температура для спиртового брожения  $26^\circ\text{C}$ , а для образования молочной кислоты —  $35\text{--}40^\circ\text{C}$ . В связи с этим брожение проводят в два этапа: первый — при температуре, оптимальной для развития дрожжей, второй — для молочнокислых бактерий.

Для приготовления пшеничного теста применяют только дрожжи, молочнокислое брожение развивается за счет случайной (дикой) микрофлоры, содержащейся в муке.

Для приготовления теста обычно используют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые применяются в винокуренном производстве. Прессованные дрожжи готовят на дрожжевых заводах. Чистая культура дрожжей из лаборатории поступает в специальный цех для получения маточной закваски дрожжей, из которой готовят производственные закваски. Очень важно избежать загрязнения чистой культуры посторонней микрофлорой, особенно дикими дрожжами, которые обладают слабой ферментативной активностью.

Выпечку хлеба производят при температуре от  $240$  до  $320^\circ\text{C}$ , в зависимости от величины изделий, качества муки. На границе корки и мякиша расположена зона испарения, происходящего при температуре  $100^\circ\text{C}$ . Во внутренних слоях теста температура повышается постепенно. Благодаря защитному действию коллоидов в хлебе создаются благоприятные условия для сохранения микроорганизмов. После выпечки в мякише хлеба со-

храняются не только споры бактерий, но и бесспорные кислотообразующие бактерии и дрожжи.

Хотя возможность сохранения в хлебе патогенных бактерий нельзя исключить, однако в санитарно-эпидемиологическом отношении большую опасность представляет загрязнение, происходящее в процессе транспортировки, хранения и продажи.

## 26.2. БОЛЕЗНИ ХЛЕБА

Болезнями печеного хлеба называют различные изменения, возникающие в нем в результате жизнедеятельности микроорганизмов, делающих хлеб **непригодным** для применения в пищу.

### Картофельная (тягучая) болезнь хлеба

Картофельная (тягучая) болезнь хлеба характеризуется тем, что мякиш превращается в липкую, иногда слизистую массу, окрашенную в желто-бурый или коричневый цвет и издающую отвратительный запах. Хлеб, пораженный картофельной болезнью, при употреблении в пищу небезразличен для здоровья.

Возбудителями картофельной болезни хлеба являются аэробные спорообразующие бактерии. В пораженном хлебе чаще встречается картофельная палочка (*Bac. mesentericus*), *Bac. megatherium*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides* и некоторые другие спорообразующие бактерии.

Все споровые палочки — возбудители картофельной болезни хлеба — предпочитают для своего развития нейтральную или слабощелочную реакцию. Поэтому хотя ржаной хлеб в большей степени, чем пшеничный, обсеменен этими бактериями, он не подвержен картофельной болезни благодаря своей высокой кислотности. Этот порок поражает главным образом пшеничный хлеб,

приготовленный из пшеничной муки низкого помола, обильно зараженный бактериями.

Картофельная болезнь возникает при длительном хранении хлеба при достаточно высокой температуре. Чаще она возникает в жаркое время года. Поражаются преимущественно крупноштучные хлебные изделия, стерилизация мякиша которых при выпечке менее полноценна.

**Методика определения зараженности муки споровыми бактериями, вызывающими картофельную болезнь.** 1 г исследуемой муки вносят в 9 мл стерильной воды и делают ряд последовательных разведений (1:10, 1:100, 1:1000), все пробирки прогревают в водяной бане 20 мин при 80°C или 5 мин при 100°C для уничтожения вегетативных форм бактерий. В чашки Петри вносят по 1 мл из каждого разведения, заливают расплавленным МПА, после застывания питательной среды чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат на 24–48 ч при 37°C. Учету подлежат чашки, на которых выросло от 30 до 300 колоний.

Определенных норм содержания споровых бактерий в муке не установлено. На практике проверку качества муки проводят путем пробной выпечки хлеба. Для этого выпеченные формовые хлебы после некоторого остывания (до температуры мякиша 40–45°C) помещают в термостат. Через 36 ч хлеб вынимают из термостата, нарезают и проверяют на наличие признаков картофельной болезни:

- если хлеб имеет нормальные органолептические свойства, муку можно использовать на общих основаниях;
- если обнаружены признаки картофельной болезни, муку используют преимущественно на изготовление мелкоштучных изделий, которые лучше пропекаются, а также на выпечку хлеба с повышенной кислотностью (на 1°Т) за счет молочнокислого брожения.

Хлеб, испеченный из пораженной муки, должен быть быстро охлажден после выпечки и реализован в течение 24 ч.

Хлеб, пораженный картофельной болезнью, не допускается для пищевых целей и подлежит уничтожению с немедленным изъятием его из магазина и со склада. Инвентарь, в котором хранился такой хлеб, обязательно подвергают дезинфекции 1% -ным раствором горячей уксусной кислоты или 2% -ным раствором едкого натра с последующей промывкой горячей водой.

### Плесневение хлеба

Плесневение хлеба происходит за счет спор плесневых грибов, попавших на поверхность готового хлеба при хранении и транспортировке, так как плесневые микроорганизмы, содержащиеся в муке, погибают при выпечке.

При температуре до 25°C развиваются *Aspergillus glaucus*, *Rhizopus nigricans* и *Penicillium crustosum*. При более высокой температуре растут преимущественно *Penicillium olivaceum* — коричнево-желтая плесень, *Aspergillus niger* — черная плесень, *Aspergillus flavus* — желто-зеленая. *Aspergillus* хорошо растет и на сухом хлебе при достаточной влажности окружающей среды.

Заплесневелый хлеб не пригоден для употребления в пищу не только вследствие дурного вкуса и запаха, но и потому, что может быть причиной заболевания человека микозами.

Для профилактики плесневения хлеба рекомендуется перевозить его в закрытых ящиках, хранить в чистом, сухом помещении и соблюдать сроки реализации.

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Провести органолептическое исследование образцов муки.
2. Провести бактериологическое исследование муки с целью определения количества МАФАНМ.

3. Провести микологическое исследование образцов муки методом посева на среды Чапека, Сабуро.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Источники обсеменения зерна и муки микроорганизмами.
2. Какие формы и виды микроорганизмов загрязняют зерно и муку?
3. С какими микроорганизмами связано прокисание муки, плесневение муки?
4. Какие микроорганизмы вызывают болезни хлеба?
5. Какими методами можно определить степень зараженности муки споровыми микроорганизмами?

---

---

# ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ

**Авирулентный, невирулентный** — отсутствие у возбудителя болезни способности вызывать инфекционный процесс в макроорганизме. См. Вирулентность.

**Агар** — сложное органическое соединение, получаемое из морских водорослей, расплавляется в воде при температуре 80–86°C, при охлаждении застывает и придает питательной среде плотную консистенцию. Агаровый студень используется в качестве компонента полужидких и плотных питательных сред в микробиологии.

**Агар мясопептонный (МПА)** — плотная или полужидкая питательная среда для культивирования микроорганизмов. МПА — основная среда в лабораторной практике, применяется в виде простого агара или сложных дифференциально-диагностических сред после добавления дополнительных веществ углеводов, индикаторов и ингибиторов.

**Агглютинация** — склеивание и выпадение в осадок взвешенных, обладающих антигенностью частиц (бактерий, форменных элементов крови и др.). В результате А. под воздействием антител происходит склеивание бактериальных корпускул. Явление А. специфично и широко применяется в иммунодиагностике инфекционных болезней.

**Агглютинины** — антитела, образующиеся в организме к определенным антигенам (агглютиногенам) и вступающие в реакцию с ними.

**Агглютинирующая сыворотка** содержит антитела, способные склеивать корпускулярные вещества (микробы), содержащие специфические антигены. А. с. получают от животных, иммунизированных против определенных инфекционных болезней. Применяют А. с. для лабораторной идентификации микробов, а также в иммунотерапии и пассивной иммунопрофилактике при инфекционных болезнях. См. Иммунная сыворотка.

**Адсорбция** — поверхностное поглощение, концентрирование и удержание газообразного или растворенного вещества на поверхности твердого тела (адсорбента). А. усиливается при повышении концентрации адсорбируемого вещества или давления и уменьшается при подъеме температуры.

**Активный центр антителя** — участок молекулы иммуноглобулина, взаимодействующий только с комплементарным участком молекулы специфического антигена. Антитела содержат один, два и более активных центра.

**Алиментарный** — зависящий от питания (кормления), связанный с передачей возбудителя через корм и воду.

**Аллергены** — вещества, которые при попадании в организм изменяют его реакции или оказывают сенсибилизирующее действие. После первичного контакта с А. организм становится сверхчувствительным к нему и при повторном контакте отвечает аллергической реакцией. Различают экзо- и эндогенные А. Экзогенные А. могут быть неинфекционные (лекарственные вещества, пищевые продукты и др.) и инфекционные (микробы, вирусы, микроскопические грибы).

**Аллергия** — изменение реакции организма, повышенная чувствительность его к различным веществам (аллергенам).

**Амфитрихи** — подвижные бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах. См. Жгутики бактерий.

**Анабиоз** — состояние организма, характеризующееся обратимым резким замедлением жизненных процессов при отсутствии видимых внешних проявлений жизни.

**Анатоксин** — токсин, утративший свою токсичность под воздействием химических или физических факторов, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства, например столбнячный А., ботулинический А.

**Анаэробы** — организмы, способные жить и развиваться при отсутствии свободного молекулярного кислорода и брать необходимую энергию при расщеплении сложных соединений, находящихся в среде обитания.

**Антагонизм** — противоположное действие, взаимное противодействие органов, лекарственных средств, микробов.

**Антагонизм микробный** — угнетение жизнедеятельности одного микроба другим. Одна из форм взаимоотношений микробов в ассоциациях. А. м. является принципиальной основой получения и применения антибиотиков.

**Антибиотики** — продукты жизнедеятельности ряда микроорганизмов (бактерий, актиномицетов, плесневых грибов),

растений или животных тканей, угнетающие рост и размножение многих микробов и даже губительно действующие на некоторые из них. Некоторые А. обладают противоопухолевым действием.

**Антигены** — вещества, вызывающие при введении в организм развитие специфических иммунологических реакций (синтез гуморальных антител или дифференциацию клона сенсibilизированных лимфоцитов).

**Антигены бактерий** — образуют сложный комплекс антигенов, состоящих из высокомолекулярных соединений белковой природы, биологически активных специфических полисахаридов и других химических соединений.

**Антигены неполноценные (гаптены)** — низкомолекулярные вещества, которые могут реагировать с антителами, но самостоятельно не способны индуцировать их синтез в организме.

**Антигенная детерминанта** — активный участок антигена.

**Антигенность** — показатель, характеризующий способность антигена индуцировать синтез антител в организме.

**Антисептика** — совокупность методов и приемов борьбы с патогенными микроорганизмами, внедрившимися в раны, ткани и полости организма.

**Антисыворотка** — сыворотка, содержащая специфические антитела против определенного антигена.

**Антитела (иммунные тела, иммуноглобулины)** — глобулины, синтезируемые в лимфоидной ткани плазматическими клетками после введения антигена в организм.

**Антитела гуморальные** — антитела, находящиеся в сыворотке крови. Определение наличия А. г. в сыворотке крови является одним из основных методов лабораторной диагностики инфекционных болезней.

**Антитела моноклональные** — антитела, синтезируемые плазматическими клетками единого клеточного клона В-лимфоцита, окончателными звеньями дифференциации которого они являются.

**Антитоксины** — антитела, образующиеся при попадании в организм токсинов, обладающих антигенными свойствами.

**Асептика** — система мероприятий, направленных на обеспечение работы в стерильных условиях, предупреждающих внедрение патогенных микроорганизмов в раны и полости исследуемого организма (объекта).

**Аттенуация** — искусственное стойкое ослабление, уменьшение вирулентности возбудителей инфекционных болезней.

**Бактериостатические средства** — лекарства, останавливающие или замедляющие размножение бактерий: сульфаниламидные препараты, антибиотики, химиотерапевтические средства.

**Бактерицидная фаза** — сущность этой фазы в том, что количество микроорганизмов в свежесвыдоенном молоке в процессе хранения уменьшается. Это объясняется наличием в молоке различных противомикробных веществ: лактенинов, бактериолизининов и лизоцима.

**Бактерицидный** — убивающий бактерии.

**Биологическая проба** — заражение лабораторных животных исследуемым материалом с целью выявления и идентификации возбудителей болезней или их токсинов.

**Биотехнология** — комплекс естественных или искусственных созданных технологических приемов для создания биологических систем или использования в промышленных и научных целях.

**Бифидобактерии** — новый кисломолочный напиток. Готовят его с использованием бифидобактерий, которые являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

**Бациллы** — палочковидные, грамположительные аэробные микробы, образующие при неблагоприятных условиях (вне организма) споры. Большинство Б. сапрофиты, некоторые служат возбудителями инфекционных болезней, например сибирской язвы (*Bac. anthracis*).

**Боксы (бактериологические)** — застекленные камеры, предназначенные для микробиологических и вирусологических исследований в асептических условиях.

**Брожение** — биологический процесс расщепления сложных органических веществ.

**Вакцина** — биологический препарат, содержащий ослабленные или убитые патогенные микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, которые применяют для активной иммунизации (вакцинации) с целью создания невосприимчивости (иммунитета) организма к определенным инфекционным болезням.

**Вакцинопрофилактика** — вакцинирование с целью профилактики инфекционных болезней. В. подразделяют на плановую и вынужденную. Плановую В. осуществляют с предохранительной целью в угрожаемой болезнью зоне, вынужденную В. — при возникновении болезни с целью ее ликвидации.

**Вирулентность** — степень патогенности и индивидуальных особенностей каждого штамма патогенного микроорганизма, способность проникать в него, преодолевать естественные защитные силы макроорганизма, размножаться в нем и образовывать токсины.

**Восприимчивость к инфекции** — способность организма отвечать на внедрение, размножение и жизнедеятельность патогенных возбудителей комплексом защитно-приспособительных реакций, развитием инфекции.

**Гемолиз** — процесс разрушения нормальных эритроцитов с выделением из них в окружающую среду гемоглобина.

**Ген** — носитель наследственной информации, передаваемой от поколения к поколению.

**Генерализация** — распространение патологического процесса из первичного локального (ограниченного) очага по всему организму.

**Генная (генетическая) инженерия** — отрасль биологической науки, изучающая закономерности конструирования *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК и поведение их в реципиентной клетке.

**Генотип** — совокупность всех наследственных факторов организма как ядерных (геном), так и неядерных, внехромосомных. Г. микроорганизмов — потенциальная способность к фенотипическому выражению любого их признака.

**Гены** — фрагменты молекулы ДНК, у некоторых вирусов РНК контролирующие синтез одного белка или пептида.

**Гетеротрофы** — в противоположность аутоотрофным микробам получают углерод главным образом из готовых органических соединений.

**Гипериммунизация** — сверхиммунизация, иммунизация животных большими дозами антигена (однократно или путем повторных введений) с целью получения специфических лечебных или диагностических сывороток.

**Гифы** — ветвящиеся нити, составляющие мицелий микроскопических грибов.

**Гнотобиология** — учение о гнотобиотах.

**Гнотобиоты** — животные, получаемые путем гистерэктомии и выращиваемые в особых условиях, полностью свободные от микрофлоры или являющиеся носителями только определенных видов микроорганизмов.

**Гомогенный** — однородный (по структуре и составу), бесструктурный, обладающий одними и теми же свойствами, не обнаруживающий воспринимаемых глазом различий строения.

**Гомологичный** — соответственный, подобный, сходный.

**Грамотрицательные бактерии** — бактерии, которые при окраске по Граму, окрашиваются в красный цвет. Основой клеточной стенки бактерий является пептидогликан, от него зависят прочность и ригидность клетки.

**Грамположительные бактерии** — бактерии, которые при окраске по Граму, окрашиваются в фиолетовый цвет. У Г. б. пептидогликан многослоен и плотный, с ним связаны тейхоевые кислоты.

**Дезинфекция** — обеззараживание, уничтожение возбудителей инфекционных болезней (бактерий, вирусов, риккетсий и т. д.) во внешней среде путем применения физических и химических средств.

**Диссоциация бактерий** — появление в популяции бактерий, отличающихся от исходного типа внешним видом и структурой колоний, а также наследственно закрепленными изменениями некоторых морфологических, культуральных и биологических свойств.

**Единица вирулентности** — величина, характеризующая степень патогенности микробов. За Е. в. принимают наименьшее количество живых микробов, вызывающих в определенный срок гибель около 80% соответствующих лабораторных животных.

**Желатин** — клей, продукт частичного гидролиза коллагена, содержащегося в хрящах и костях животного.

**Жгутики бактерий** — органоиды движения бактерий.

**Зооантропонозы** — группа заразных болезней, общих для животных и человека.

**Зоонозы** — группа болезней, свойственная только животным (например контагиозная плевропневмония крс, чума свиней, мыт лошадей).

**Идентификация микроорганизмов** — система микроскопических, культуральных, биохимических, серологических исследований и определения патогенных свойств для установления этиологического агента, определения его вида.

**Изменчивость микроорганизмов** — способность к изменениям некоторых признаков и свойств при жизни.

**Иммунизация** — метод специфической профилактики инфекционных болезней путем создания в организме искусственного иммунитета. Различают активную и пассивную И.

**Иммунитет** — невосприимчивость, способность организма защищать себя от веществ как инфекционной, так и неинфекционной природы, носящих для него генетически чужеродную

информацию, с целью сохранения необходимого для существования гомеостаза. Различают активный, пассивный и другие виды И.

**Иммунитет антибактериальный** — невосприимчивость организма к определенным бактериальным инфекциям.

**Иммунная сыворотка** — сыворотка, содержащая специфические антитела, полученная от иммунизированного (вакцинированного) или переболевшего животного.

**Иммунокомпетентность** — иммунореактивность, способность организма ответить на введение антигена иммунной реакцией.

**Иммунологическая память** — способность организма отвечать ускоренной и усиленной иммунной реакцией при повторном контакте с антигеном.

**Иммунологическая толерантность** — иммунологическая ареактивность, состояние организма, при котором не происходит иммунной ответной реакции на введение антигена.

**Иммунотерапия** — метод лечения инфекционных больных путем воздействия на иммунную систему организма.

**Инфекционный процесс** — комплекс реакций, возникающих в макроорганизме при инфекции и направленных на обеспечение гомеостаза и равновесия с окружающей средой.

**Инфекция** — явление, специфической сущностью которого является внедрение и размножение инфекционного агента в макроорганизме с последующим развитием различных форм их взаимоотношений — от носительства возбудителя до выраженного проявления болезни.

**Кефир** — кисломолочный продукт, получаемый из молока с помощью кефирных грибков.

**Клон** — полученное бесплодным путем генетически однородное вегетативное потомство одного вируса или одноклеточного (многоклеточного) организма.

**Коли-индекс** — количество особей кишечной палочки, содержащихся в 1 л (для твердых тел — в 1 кг) исследуемого продукта (воды).

**Коли-титр** — величина, выражающая наименьшее количество исследуемого продукта (воды — в мл, для твердых тел — в г), в котором обнаружена одна кишечная палочка.

**Колония бактериальная** — изолированное скопление клеток бактерий одного вида, сформированное на поверхности или внутри плотных или полужидких питательных сред в результате размножения одной или нескольких бактериальных клеток.

**Комплемент** — комплекс термолabileльных белков свежей сыворотки крови животных и человека, играющий важную роль в иммунологических реакциях организма.

**Консерванты** — вещества, используемые для предотвращения разложения органических соединений.

**Контагиозность** — способность болезни распространяться вследствие передачи возбудителя при непосредственном соприкосновении больных и здоровых животных или через промежуточные объекты.

**Контаминация** — обсеменение поверхности тела животного, предметов ухода, почвы, воды, кормов, биопрепаратов и других объектов патогенными микроорганизмами.

**Конъюгация** — процесс временного объединения двух особей у одноклеточных организмов, связанный с переносом генетического материала из одной особи в другую, эволюционный аналог полового размножения.

**Культура бактериальная** — популяция жизнеспособных бактерий, выращенная на плотной или в жидкой питательной среде.

**Культура чистая** — культура микроорганизма, содержащая особей лишь одного биологического вида.

**Кумыс** — получают из парного кобыльего непастеризованного молока с использованием чистых культур молочнокислых палочек и дрожжей.

**Летальная доза (ЛД<sub>50</sub>)** — смертельная доза (*dosis letalis* — DL), доза микроорганизмов, вызывающая смерть у 50% экспериментально зараженных животных.

**Лизис микроорганизмов** — растворение микроорганизмов под влиянием специфических бактериолизин, бактериофагов, лизоцима.

**Лизоцим** — энзим, расщепляющий сложные полисахариды клеточной оболочки и вызывающий лизис грамположительных микроорганизмов (бактериологический энзим). Л. содержится в белке яйца, в слизистой оболочке носовой полости и кишечника, в печени и селезенке, различных жидкостях организма (слезе, слюне, молоке, сыворотке крови).

**Лиофилизация** — лиофильная сушка, сублимационное высушивание, метод высушивания биологических объектов (например, вирусов, микробов) и пищевых продуктов в замороженном состоянии под вакуумом.

**Лофотрихи** — подвижные бактерии, у которых жгутики располагаются в виде пучка на одном конце.

**Мазки** — препараты, приготовленные из исследуемого материала (гноя, мокроты, крови и т. д.), нанесенного на предметное стекло, и предназначенные для изучения под микроскопом.

**Макрофаги** — большие фагоциты, фагоцитарные клетки, интенсивно фагоцитирующие чужеродный для организма материал.

**Метаболизм** — основной обмен веществ, совокупность химических превращений, происходящих в живом организме, состоящих из ассимиляционной (анаболизм) и диссимиляционной (катаболизм) фаз.

**Микробный пейзаж** — понятие, характеризующее особенности микроорганизмов при их взаимодействии друг с другом, с окружающей средой.

**Микроорганизмы** — мельчайшие организмы, не видимые невооруженным глазом.

**Микрофлора** — микробный пейзаж, совокупность различных видов микроорганизмов.

**Моноклональные антитела** — строго специфические антитела, способные выявить минимальные различия в химическом составе и пространственной конфигурации молекул.

**Монотрихи** — подвижные бактерии, имеющие по одному жгутику на одном из полюсов бактериальной клетки.

**Мутагены** — физические и химические факторы, вызывающие в организме стойкие наследственные изменения — мутации.

**Мутация, мутационная изменчивость** — наследуемые изменения гена или генов, контролируемых определенными наследственными признаками.

**Масло** — сырьем для получения масла являются 25–35% — ные сливки, в которые вносят закваску из молочнокислого стрептококка.

**Молочнокислая фаза** — период нарастания кислотности молока под действием молочнокислого стрептококка, на смену им приходят кислотоустойчивые молочнокислые палочки, и молоко в этой фазе превращается в кисломолочный продукт.

**Нормальная микрофлора молока** — это молочнокислые бактерии. Основным продуктом их жизнедеятельности является молочная кислота.

**Нормальные антитела** — в крови человека и животных обнаруживают антитела, которые могут реагировать с различными антигенами (эритроцитами, бактериями и т. д.), хотя ранее организм не подвергался иммунизации этими антигенами.

**Нуклеоид** — ядро прокариотов, состоящее из единственной гигантской хромосомы, не изолированной от цитоплазмы мембраной.

**Нуклеотиды** — составные части ДНК и РНК. Каждый Н. в молекуле ДНК состоит из одного азотистого основания, пятиуглеродного углевода — дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. В РНК сахар представлен рибозой, а тимин заменен урацилом.

**Паразит** — организм, живущий на поверхности или внутри другого организма и питающийся за его счет.

**Пастеризация** — способ обеззараживания органических жидкостей (молока, фруктовых соков и т. д., от имени французского ученого Л. Пастера). Используют длительную П. (30 мин при 65°C), кратковременную (15–20 с при 72–75°C) и моментальную (при 85–90°C) без выдержки. Погибают вегетативные клетки, споры при этом не уничтожаются. Продукт обязательно охлаждают до 4–6°C.

**Патогенность, болезнетворность** — способность микробов вызывать инфекционный процесс у макроорганизмов определенного вида.

**Петля бактериальная (бактериологическая петля)** — инструмент для посева и пересева микроорганизмов, состоящий из платиновой проволочной петли, укрепленной в держателе. П. б. из платины быстро накаливается в пламени горелки и также быстро остывает, когда ее извлекают из огня.

**Пиемия** — форма сепсиса, отличающаяся от септицемии более длительным течением и гематогенным образованием вторичных очагов гнойного воспаления (метастазов) в различных органах (в печени, легких).

**Питание микроорганизмов** — усвоение питательных веществ: аминокислот, углеводов, витаминов, минеральных веществ и др.

**Полиморфизм** — форма существования одного и того же образования в различных видах.

**Популяция** — совокупность особей одного вида макро- и микроорганизмов, длительно населяющих среду при определенных условиях.

**Пороки молока** — вызывает гнилостная микрофлора: маслянокислые бактерии, плесневые грибы, кишечная палочка.

**Постулаты Коха** — по имени немецкого ученого Р. Коха (1843–1910), постулаты, или триады, рассматривающие условия, при которых данный микроорганизм может быть признан возбудителем исследуемой болезни.

**Пробиотики** — биопрепараты, содержащие живые, антагонистически активные бактерии. Применяются для профилактики и лечения инфекционных желудочно-кишечных болезней животных.

**Простокваша** — молоко в фазе молочнокислых бактерий.

**Препараты биологические, биопрепараты** — средства биологического происхождения, используемые для диагностики, профилактики и лечения заразных болезней, стимулирования роста сельскохозяйственных животных.

**Преципитация** — иммунологическая реакция, взаимодействие растворимого антигена (преципитиногена) и антитела (преципитина) в присутствии электролита с образованием преципитата.

**Продромальный период** — период предвестников инфекционной болезни, характеризующийся первыми, но не всегда специфическими для конкретной болезни симптомами (температура, слабость, угнетенное состояние, отсутствие аппетита).

**Прокариоты** — доядерные микробы, характеризующиеся отсутствием изолированного ядра. См. Бактерии.

**Резистентность естественная** — повышенная устойчивость организма к инфекции, обусловленная не активной или пассивной иммунизацией, а его врожденными биологическими особенностями.

**Рековалесцент** — организм, находящийся в стадии выздоровления.

**Сапрофиты** — бактерии и грибы, питающиеся органическими веществами отмерших организмов или выделениями живых.

**Сенаж** — это разновидность консервированного корма из провяленных трав, главным образом бобовых, убранных в начале бутонизации, и влажностью в пределах 40–50%, созревание идет в анаэробных условиях.

**Сено** — старый и наиболее распространенный способ консервирования зеленой массы методом сушки.

**Сенсибилизация** — приобретение организмом специфической повышенной чувствительности к чужеродным веществам, чаще белковой природы, аллергенам.

**Сепсис** — состояние организма, при котором патогенные микроорганизмы, проникшие из первичного очага инфекции в кровь, размножаются в ней и заносятся во все ткани и органы, где вызывают воспалительные и дегенеративно-некротические процессы. Клиническая картина С. не зависит от вида возбудителя инфекции.

**Септикопиемия** — смешанная форма сепсиса, периодическое поступление в кровь микробов из первичного септического очага и образование вторичных абсцессов (очагов гнойного воспаления).

**Септицемия** — форма сепсиса, при которой наличие патогенных микроорганизмов в крови не сопровождается образованием метастических очагов гнойного воспаления.

**Серодиагностика** — методы лабораторной иммунодиагностики, входящие в диагностический комплекс инфекционных болезней.

**Серологические реакции** — методы иммунодиагностики, разработанные для установления в сыворотке крови антител или антигена.

**Серопрофилактика** — пассивная иммунизация — метод, при котором в организм для предотвращения инфекционной болезни вводят гипериммунные или реконвалесцентные сыворотки, содержащие специфические антитела к антигенам возбудителей этих болезней. См. Иммунная сыворотка.

**Силосование** — сложный микробиологический и биологический процесс консервирования сочной растительной массы.

**Споры** — зародышевые клетки, служащие для бесполового размножения некоторых растений (грибы, водоросли) и части одноклеточных.

**Среды питательные** — различные искусственные среды для культивирования микробов с целью выделения возбудителя болезни из исследуемого материала и определения его вида для накопления микробной массы при изготовлении биологических препаратов.

**Стерилизация** — 1) уничтожение микробов с помощью высокой температуры или химических веществ; 2) обеспложивание, лишение способности к оплодотворению.

**Сыр** — молочный продукт, получаемый в результате сычужного свертывания молока, обработке сгустка, его созревания с целью получения продукта со специфическим запахом, консистенцией и вкусом.

**Таксономические категории** — так называемые таксоны, соподчинение иерархическим группам объектов: вид, род, семейство, порядок, класс, отдел.

**Таксономия** — раздел систематики, изучающий принципы, методы и правила классификации организмов, в том числе и микробов.

**Тиндализация** — метод дробной стерилизации.

**Токсемия** — наличие токсинов в крови, общее болезненное состояние организма, вызванное циркуляцией в крови токсинов.

**Токсины** — вещества бактериального, растительного или животного происхождения, вызывающие при попадании в организм человека или животного заболевание или смерть.

**Условно патогенные микробы** — потенциально патогенные микробы, обитающие в макроорганизме как комменсалы и вызывающие инфекционный процесс лишь при ослаблении резистентности хозяина.

**Фагоцитоз** — процесс активного поглощения клетками организма попадающих в него патогенных живых или убитых микробов и других чужеродных частиц с последующим перевариванием при помощи внеклеточных ферментов.

**Фагоциты** — клетки, с помощью которых осуществляется фагоцитоз.

**Фенотип** — совокупность признаков, структур и свойств организма, сформировавшихся в процессе его индивидуального развития и определяющих сущность данной особи.

**Циля — Нильсена метод** — сложный метод окраски, применяемый для дифференцировки кислотоустойчивых микробов от кислотоподатливых, предложенный немецкими учеными Цилем и Нильсеном.

**Штамм** — культура микроорганизма одного вида с одинаковыми морфологическими и биологическими свойствами.

**Экология микроорганизмов** — наука, изучающая взаимоотношения микроорганизмов с окружающей средой.

**Энзимы бактерий** — биологические катализаторы белковой природы, обладающие специфичностью и играющие важную роль в обмене веществ микроорганизмов.

**Эпизоотия** — средняя степень напряженности эпизоотического процесса. Характеризуется довольно широким распространением какой-либо инфекционной болезни, охватывающей хозяйство, район, область, страну.

**Этиология** — раздел патологии о причинах и условиях возникновения болезней.

**Эукариоты** — организмы (все, кроме бактерий, включая цианобактерии), обладающие, в отличие от прокариот, оформленным клеточным ядром, ограниченным от цитоплазмы оболочкой.

---

---

# ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Механическую часть светового микроскопа составляют:
  - 1) тубус;
  - 2) окуляр;
  - 3) осветительный аппарат;
  - 4) макровинт;
  - 5) предметный столик;
  - 6) микровинт;
  - 7) башмак.
2. Оптическую часть светового микроскопа составляют:
  - 1) микровинт;
  - 2) объектив;
  - 3) «револьвер»;
  - 4) окуляр;
  - 5) конденсор.
3. Суховоздушный объектив:
  - 1)  $\times 90$ ;
  - 2)  $\times 40$ ;
  - 3)  $\times 120$ ;
  - 4)  $\times 8$ .
4. Разрешающая способность микроскопа — это:
  - 1) его максимальное увеличение;
  - 2) максимальная четкость изображения;
  - 3) расстояние между двумя точками, которые не сливаются в одну;
  - 4) минимальное расстояние между двумя точками, которые воспринимаются глазом раздельно.

5. Источник освещения в электронном микроскопе:
- 1) электростатическое поле;
  - 2) УФЛ;
  - 3) электроны.
6. Установите правильную последовательность при приготовлении препаратов для микроскопии:
- 1) изготовление мазка, фиксация, высушивание, окрашивание;
  - 2) изготовление мазка, высушивание, фиксация, окрашивание;
  - 3) изготовление мазка, фиксация, высушивание.
7. Фиксация мазков проводится с целью:
- 1) прикрепить мазок к предметному стеклу;
  - 2) убить микробов, находящиеся в патматериале;
  - 3) выявить внутреннюю структуру бактерий;
  - 4) фиксировать жгутики.
8. Определите, какие краски имеют красный цвет:
- 1) генцианвиолет;
  - 2) фуксин;
  - 3) нейтральрот;
  - 4) кристаллвиолет;
  - 5) сафранин.
9. Бактерии по-разному окрашиваются по Граму, так как:
- 1) имеют капсулу;
  - 2) различаются по форме клеток;
  - 3) различаются по структуре клеточной стенки и химическому составу клеточной стенки;
  - 4) имеют различный химический состав цитоплазмы.
10. Клеточная стенка грамположительных бактерий, в отличие от грамотрицательных, имеет:
- 1) фосфолипиды;
  - 2) около 70% пептидогликана;
  - 3) липопротеины;
  - 4) до 30% пептидогликана;
  - 5) тейховые кислоты;
  - 6) рыхлую клеточную стенку.

11. Выберите правильную последовательность красок и реактивов, необходимых для окраски препаратов по Граму:

- 1) генцианвиолет, обесцвечивание спиртом, промывание водой, раствор Люголя, разведенный фуксин;
- 2) разведенный фуксин, раствор Люголя, генцианвиолет, обесцвечивание спиртом, промывание водой;
- 3) генцианвиолет, раствор Люголя, обесцвечивание спиртом, промывание водой, разведенный фуксин;
- 4) обесцвечивание спиртом, промывание водой, раствор Люголя, генцианвиолет, разведенный фуксин.

12. По Граму грамтрицательные бактерии окрашиваются:

- 1) в красный цвет;
- 2) в фиолетовый цвет.

13. Метод окрашивания кислото-щелочеустойчивых микроорганизмов:

- 1) по Ольту;
- 2) по Козловскому;
- 3) по Цилю — Нильсену.

14. Методы окрашивания капсул:

- 1) по Граму;
- 2) по Ольту;
- 3) по Романовскому — Гимзе;
- 4) по Цилю — Нильсену.

15. Методы окрашивания спор:

- 1) по Граму;
- 2) по Ольту;
- 3) по Романовскому — Гимзе;
- 4) по Златогорову;
- 5) по Цилю — Нильсену.

16. При приготовлении МПБ используют:

- 1) мясной экстракт, пептон, поваренную соль;
- 2) мясной экстракт, пептон, агар-агар;
- 3) водопроводную воду, поваренную соль, пептон;
- 4) мясной экстракт, пептон, соль, сыворотку крови.

17. При приготовлении МПБ 2–3% агар-агара включают:

- 1) для повышения питательных свойств среды;
- 2) для создания плотной консистенции;

- 3) для установления рН;
- 4) для создания изотоничности.

**18.** К обязательным требованиям питательных сред относятся:

- 1) стерильность;
- 2) определенный рН;
- 3) наличие питательных веществ;
- 4) наличие животных и растительных компонентов;
- 5) прозрачность;
- 6) все перечисленные свойства.

**19.** Данные питательные среды по применению относятся к обычным:

- 1) МПА и МПБ;
- 2) МПБ и МПА с желчью, с сывороткой крови;
- 3) среда Эндо;
- 4) среда Гисса;
- 5) МПА с 10% поваренной соли.

**20.** Данные питательные среды по применению относятся к дифференциально-диагностическим:

- 1) МПА и МПБ;
- 2) МПБ и МПА с желчью, с сывороткой крови;
- 3) среда Эндо;
- 4) среда Гисса;
- 5) МПА с 10% поваренной соли.

**21.** Элективные питательные среды используют с целью:

- 1) выделения определенной группы или вида бактерий;
- 2) накопления бактерий;
- 3) дифференциации.

**22.** Для получения изолированных колоний используют питательные среды:

- 1) жидкие;
- 2) плотные;
- 3) сухие;
- 4) полужидкие.

**23.** Для выращивания патогенных бактерий оптимальным является рН:

- 1) 7,2–7,4;

- 2) 6,4–6,6;
- 3) 5–4,2.

**24.** Для выращивания патогенных грибов оптимальным является рН:

- 1) 7,2–7,4;
- 2) 6,4–6,6;
- 3) 5–4,2.

**25.** Стерилизацией называется:

- 1) уничтожение патогенных микроорганизмов в объектах или окружающей среде;
- 2) комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов в какой-либо объект;
- 3) полное уничтожение на/в объекте всех жизнеспособных микроорганизмов и спор.

**26.** К физическим методам стерилизации относят:

- 1) гамма-лучи;
- 2) высокую температуру;
- 3) фильтрование через бактериальный фильтр;
- 4) ультрафиолетовые лучи;
- 5) дезинфекцию;
- 6) фламбирование.

**27.** В сушильных шкафах сухим жаром стерилизуют:

- 1) стеклянную посуду;
- 2) простые питательные среды;
- 3) сыворотки;
- 4) термостойкие порошкообразные лекарственные вещества.

**28.** Дробная стерилизация при температуре 56–58°C в течение 5–6 дней по часу в сутки называется:

- 1) автоклавирование;
- 2) пастеризация;
- 3) тиндализация;
- 4) кипячение.

**29.** Режим работы, применяемый для пастеризации:

- 1) 100°C, 30 мин;
- 2) 50°C, 20 мин;

- 3) 80°C, 10 мин;
- 4) 80°C, 30 мин.

**30.** Для стерилизации питательных сред с углеводами применяют:

- 1) дробную стерилизацию текучим паром;
- 2) кипячение;
- 3) пастеризацию;
- 4) автоклавирование.

**31.** Режим работы автоклава для стерилизации инфицированного материала:

- 1) 80°C при давлении в 1 атм;
- 2) 56°C при давлении в 0,5 атм;
- 3) 126°C при давлении в 1,5 атм.

**32.** Во время посева на плотные питательные среды в пробирки пробки:

- 1) кладут на стол;
- 2) зажимают мизинцем правой руки;
- 3) зажимают в левой руке большим пальцем.

**33.** После прокаливания бактериологической петли:

- 1) сразу захватывают материал;
- 2) охлаждают петлю только о внутреннюю сторону пробирки;
- 3) охлаждают петлю о внутреннюю сторону пробирки и прикасаются к незасеянному участку агара.

**34.** При посеве уколом в столбик агара пробирку держат:

- 1) вертикально дном вниз;
- 2) под наклоном дном вверх;
- 3) горизонтально.

**35.** Оптимальная температура для культивирования бактерий:

- 1) 37–38°C;
- 2) 0–10°C;
- 3) 36,6°C;
- 4) 25°C.

**36.** Оптимальная температура для культивирования грибов:

- 1) 37–3°C;

- 2) 0–10°C;
- 3) 36,6°C;
- 4) 25°C.

**37.** Для культивирования микроорганизмов при заданной температуре используют:

- 1) автоклав;
- 2) аппарат Коха;
- 3) термостат;
- 4) стерилизатор.

**38.** Чистая культура — это:

- 1) популяция микробов, состоящая из особей одного вида;
- 2) культура микроорганизмов, полученная из одной особи (одноклеточная культура);
- 3) культура микроорганизмов одного вида, выделенная из определенного источника (организм животного, окружающая среда);
- 4) культура микроорганизмов одного вида, различающаяся по некоторым признакам.

**39.** При макроскопическом изучении колоний на жидких питательных средах учитывают:

- 1) цвет среды;
- 2) прозрачность
- 3) размер колоний;
- 4) осадок;
- 5) наличие и характер пленки.

**40.** Культуральные свойства бактерий — это:

- 1) способность вызывать определенное нозологическое заболевание;
- 2) способность ферментировать определенные химические свойства;
- 3) характер роста на плотных и жидких питательных средах.

**41.** Конечные продукты протеолиза:

- 1) сахароза;
- 2) индол;
- 3) молоко;
- 4) сероводород;

- 5) нитраты;
- 6) аммиак.

42. Индикатор, используемый для определения индола:

- 1) лакмус;
- 2) уксусный свинец;
- 3) щавелевая кислота.

43. Бактерии, способные вызывать образование прозрачных зон вокруг колоний при выращивании на питательной среде с добавлением 10% крови, обладают свойствами:

- 1) сахаролитическими;
- 2) протеолитическими;
- 3) гемолитическими;
- 4) восстанавливающими.

44. Для выявления сахаролитических свойств культуру засевают на:

- 1) кровяной МПА;
- 2) свернутую кровяную сыворотку;
- 3) молоко;
- 4) среды Гисса.

45. Для определения каталазы используют:

- 1) молоко;
- 2) перекись водорода;
- 3) МПЖ;
- 4) среды Гисса.

46. Протеолитические свойства можно выявить на:

- 1) кровяном МПА;
- 2) МПЖ;
- 3) молоке;
- 4) средах Гисса.

47. Наличие аммиака определяют:

- 1) полоской индикаторной бумаги, пропитанной раствором уксуснокислого свинца;
- 2) полоской индикаторной бумаги, пропитанной раствором щавелевой кислоты;
- 3) полоской розовой лакмусовой бумаги.

48. Индикатор, используемый для определения сероводорода:

- 1) раствор щавелевой кислоты;
- 2) раствор уксуснокислого свинца;
- 3) розовая лакмусовая бумага.

49. Для определения чувствительности культуры к антибиотикам используют метод:

- 1) серийных разведений;
- 2) «висячей капли»;
- 3) Шукевича;
- 4) диффузии в агар.

50. Антибиотики — это:

- 1) специфические продукты жизнедеятельности бактерий;
- 2) грибов;
- 3) растений;
- 4) животных;
- 5) человека.

51. Ингибирующее действие антибиотиков проявляется в питательных средах:

- 1) задержкой роста бактерий;
- 2) гибелью бактерий;
- 3) стимуляцией роста бактерий.

52. Зона задержки роста микроорганизмов до 15 мм является показателем:

- 1) достаточной чувствительности к антибиотикам;
- 2) малой чувствительности;
- 3) отсутствия чувствительности к антибиотикам.

53. Бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки:

- 1) перитрихи;
- 2) лофотрихи;
- 3) амфитрихи;
- 4) монотрихи.

54. Для определения подвижности бактерий используют:

- 1) метод Дригальского;
- 2) метод «раздавленной капли»;
- 3) метод серийных разведений;

- 4) метод тиндализации;
- 5) метод «висячей капли».

55. Бактерии прикрепляются к поверхности клеток при помощи:

- 1) капсулы;
- 2) жгутиков;
- 3) пили;
- 4) мезосом.

56. Заражение лабораторных животных проводят с целью:

- 1) выделения чистой культуры возбудителя из исследуемого материала;
- 2) идентификации возбудителя;
- 3) определения культуральных свойств возбудителя;
- 4) определения биохимических свойств возбудителя.

57. Для заражения лабораторных животных не используют:

- 1) внутривенное заражение;
- 2) интраназальное заражение;
- 3) ректальное заражение;
- 4) оральное заражение.

58. Грибы относятся к:

- 1) прокариотам;
- 2) эукариотам.

59. Низшие грибы имеют мицелий:

- 1) септированный;
- 2) несептированный.

60. Грибы, обладающие способностью к половому размножению:

- 1) специализированные;
- 2) совершенные;
- 3) несовершенные.

61. Микроскопию грибов проводят при помощи объектива:

- 1)  $\times 100$ ;
- 2)  $\times 40$ ;
- 3)  $\times 90$ .

**62.** Основные рода грибов:

- 1) *Aspergillus*;
- 2) *Stachybotrys*;
- 3) *Mycoplasma*;
- 4) *Fusarium*.

**63.** Для выделения чистой культуры микроскопических грибов используются среды:

- 1) МПА;
- 2) Китта — Тароцци;
- 3) Сабуро;
- 4) Чапека.

**64.** Для определения микробного числа воздуха используют:

- 1) МПА;
- 2) МПБ;
- 3) среду Сабуро;
- 4) молочный агар.

**65.** По формуле Омелянского на площадь чашки с питательной средой  $100 \text{ см}^2$  оседает столько микроорганизмов, сколько содержится в 10 л воздуха в течение:

- 1) 1 ч;
- 2) 30 мин;
- 3) 10 мин;
- 4) 5 мин.

**66.** Допустимые санитарно-бактериологические показатели для воздуха животноводческих помещений летом:

- 1) 10 бактерий в  $1 \text{ м}^3$ ;
- 2) 100 бактерий в  $1 \text{ м}^3$ ;
- 3) 500–1000 бактерий в  $1 \text{ м}^3$ ;
- 4) 1500–2500 бактерий в  $1 \text{ м}^3$ .

**67.** Показателем загрязнения воздуха в животноводческих помещениях являются:

- 1) кишечные палочки;
- 2) споры актиномицетов;
- 3) стафилококки;
- 4) дрожжеподобные грибы;
- 5) бактерии.

- 68.** К почвенным инфекциям относятся возбудители:
- 1) сибирской язвы;
  - 2) сальмонеллеза;
  - 3) хламидиоза;
  - 4) столбняка;
  - 5) злокачественного отека.
- 69.** Коли-титр воды — это:
- 1) число кишечных палочек в 1 л воды;
  - 2) число кишечных палочек в 1 мл воды;
  - 3) объем, в котором обнаруживается одна кишечная палочка.
- 70.** Методы определения коли-титра воды:
- 1) метод бродильных проб;
  - 2) метод мембранных фильтров;
  - 3) метод серийных разведений;
  - 4) метод «висячей капли».
- 71.** Коли-индекс воды — это:
- 1) число кишечных палочек в 1 л воды;
  - 2) объем, в котором обнаруживается одна кишечная палочка;
  - 3) число кишечных палочек в 1 мл воды.
- 72.** При помутнении лактозопептонной среды после посева проб воды пересев делается на среду:
- 1) Китта — Тароци;
  - 2) Чапека;
  - 3) Эндо;
  - 4) Вильсона — Блера.
- 73.** По медицинскому ГОСТ коли-титр для водопроводной воды:
- 1) менее 100 мл;
  - 2) 1000 мл;
  - 3) не менее 333 мл.
- 74.** Если мазок мяса окрашен удовлетворительно, видны кокки и небольшое количество палочек, то мясо считается:
- 1) совершенно свежим;
  - 2) условно годным;
  - 3) несвежим.

**75.** Микробное число для молока 1-го класса:

- 1) менее 500 тыс.;
- 2) 4 млн;
- 3) 1 млн;
- 4) 2 млн.

**76.** При микробиологической оценке молока используются:

- 1) редуктазная проба;
- 2) проба с резазурином;
- 3) метод Шукевича;
- 4) метод серийных разведений.

**77.** Кислотность молока — это:

- 1) количество мл 0,1 N раствора NaOH, затраченного на нейтрализацию 10 мл молока, умноженное на 10;
- 2) количество молока (в мл), содержащее одну кишечную палочку;
- 3) время, в течение которого обесцвечивается 5 мл молока при добавлении капли 1% -ного раствора метиленовой синьки.

**78.** Кислотность молока измеряется в:

- 1) °Д;
- 2) °Т;
- 3) по Фаренгейту;
- 4) ангстремах.

**79.** Молоко считается доброкачественным, если коли-титр:

- 1) равен 0,1 мл;
- 2) менее 0,2 мл;
- 3) равен 0,3 мл;
- 4) равен 1 мл.

**80.** Молочнокислое брожение заключается в превращении:

- 1) арабинозы в молочную кислоту;
- 2) лактозы в молочную кислоту;
- 3) фруктозы в молочную кислоту;
- 4) сахарозы в глюкозу.

**81.** Укажите вид генетической рекомбинации, если передача генетического материала клетки-донора в клетку-реципиента произошла при непосредственном контакте через пили:

- 1) трансформация;
- 2) трансдукция;
- 3) конъюгация.

**82.** Требования, предъявляемые к питательным средам:

- 1) стерильность;
- 2) наличие источников азота и углеводов;
- 3) цвет среды;
- 4) объем и запах среды.

**83.** Укажите методы стерилизации молока, сока и пива, не инактивирующие их полезные биологические свойства:

- 1) кипячение;
- 2) пастеризация;
- 3) автоклавирование;
- 4) прокаливание.

**84.** Для стерилизации воздуха обычно применяют:

- 1) лучи Рентгена;
- 2) лампы ультрафиолетового облучения;
- 3) вентиляцию помещения;
- 4) проветривание.

**85.** Укажите правильную последовательность смены фаз молока при хранении:

- 1) смешанная микрофлора, бактерицидная, грибковая, молочнокислая;
- 2) бактерицидная, грибковая, смешанная, молочнокислая;
- 3) молочнокислая, смешанная, бактерицидная, грибковая;
- 4) бактерицидная, смешанная, молочнокислая, грибковая.

**86.** Укажите правильный вариант состава закваски для приготовления сыра:

- 1) кефирные грибки;
- 2) закваска из дрожжей;
- 3) сычужный фермент и молочнокислые бактерии;
- 4) закваска из болгарской палочки.

**87.** Укажите виды микроорганизмов, относящихся к нормальной микрофлоре пищеварительного тракта животных:

- 1) кишечная палочка;
- 2) микоплазмы;
- 3) бруцеллы;
- 4) энтерококки.

**88.** Цель применения окраски по Граму:

- 1) для изучения тинкториальных свойств;
- 2) для обнаружения капсулы;
- 3) для обнаружения спор;
- 4) для обнаружения жгутиков.

**89.** Цель применения МПБ в бактериологии:

- 1) для изучения биохимических свойств бактерий;
- 2) для изучения культуральных свойств бактерий;
- 3) для изучения морфологических свойств бактерий;
- 4) для культивирования анаэробных бактерий.

**90.** Цель применения МПА в бактериологии:

- 1) для изучения биохимических свойств бактерий;
- 2) для изучения культуральных свойств бактерий;
- 3) для культивирования анаэробных бактерий;
- 4) для накопления микробной массы.

**91.** Назовите питательные среды для культивирования анаэробов:

- 1) МПА;
- 2) МПБ;
- 3) МППБ (среда Китта — Тароцци);
- 4) среда Сабуро.

**92.** Назовите питательные среды для культивирования микроскопических грибов:

- 1) МПА;
- 2) среда Эндо;
- 3) среда Чапека;
- 4) МППБ.

**93.** Укажите методы полной стерилизации питательных сред, применяемых в бактериологических лабораториях:

- 1) прокаливание;
- 2) кипячение;
- 3) автоклавирование;
- 4) пастеризация.

**94.** Укажите источники экзогенного загрязнения мяса микроорганизмами:

- 1) руки рабочего;
- 2) инструменты;

- 3) внутренние органы больного животного;
- 4) все ответы верны.

95. Укажите методы стерилизации молока, сока и пива, не инактивирующие их биологические свойства:

- 1) кипячение;
- 2) пастеризация;
- 3) прокаливание;
- 4) электрический сушильный шкаф.

96. Укажите виды микроорганизмов, вызывающих плесневение масла:

- 1) *Penicillium*, *Aspergillus* и *Mucor*;
- 2) молочнокислые бактерии;
- 3) маслянокислые бактерии;
- 4) уксуснокислые бактерии.

97. Укажите основные факторы патогенности возбудителя ботулизма:

- 1) эндотоксины;
- 2) способность к адгезии;
- 3) экзотоксин;
- 4) капсула.

98. Укажите специфическую микрофлору сладкосливочного масла:

- 1) *Str. Lactis*;
- 2) *E. coli*;
- 3) *Bac. subtilis*;
- 4) все ответы верны.

99. Санитарно-показательным микроорганизмам относятся:

- 1) бактерии группы кишечной палочки;
- 2) микобактерии;
- 3) бацилла сибирской язвы;
- 4) вирус ящура.

100. К аэробным аммонификаторам относятся:

- 1) стафилококки;
- 2) *Bac. subtilis*;
- 3) бруцеллы;
- 4) вирус бешенства.

**101.** Для определения коли-титра почвы методом бродильных проб используются питательные среды:

- 1) среда Кесслера;
- 2) МПБ;
- 3) МБА;
- 4) кровяной агар.

**102.** Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в воде определяют:

- 1) путем посева на МПА;
- 2) путем посева на МППБ;
- 3) путем посева на среду Эндо;
- 4) путем посева на среду Ревина.

**103.** Коли-индекс показывает число кишечных палочек:

- 1) в 10 мл воды;
- 2) в 100 мл воды;
- 3) в 500 мл воды;
- 4) в 1000 мл воды.

**104.** Индикацию кишечной палочки в мясе определяют:

- 1) путем посева в среду Кесслера;
- 2) путем посева в среду МППБ;
- 3) путем посева в среду Чапека;
- 4) путем посева в среду Сабура.

**105.** Обеззараживание условногодного мяса проводят:

- 1) провариванием в открытых котлах в течение 3 ч;
- 2) провариванием в закрытых котлах в течение 2 ч;
- 3) провариванием в автоклавах в течение 1 ч.

**106.** Индикацию БГКП в мясе осуществляют:

- 1) путем высева в жидкие лактозосодержащие среды;
- 2) путем высева в среду Плоскирева;
- 3) путем высева в среду Гиса;
- 4) путем высева в кровяно-сахарный агар.

**107.** Индикацию золотистого стафилококка проводят:

- 1) путем высева на элективные питательные среды;
- 2) путем высева в сахарный агар;
- 3) путем высева в картофельную среду;
- 4) путем высева в мозговую среду.

---

---

## ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

№ вопроса	Ответ	№ вопроса	Ответ
1	1, 3–7	24	3
2	2, 4, 5	25	3
3	2, 4	26	1–4, 6
4	2	27	1
5	3	28	3
6	2	29	3, 4
7	1, 2	30	1
8	2, 3	31	3
9	3	32	2
10	2, 5	33	3
11	3	34	2
12	2	35	1
13	1, 3	36	4
14	2, 3	37	3
15	3	38	1
16	1	39	1, 2, 4, 5
17	2	40	3
18	1–3, 5	41	2, 4, 6
19	1	42	3
20	2–5	43	3
21	1	44	4
22	2	45	2
23	1	46	2, 3

№ вопроса	Ответ	№ вопроса	Ответ
47	3	78	2
48	2	79	3
49	1, 4	80	2
50	1–4	81	3
51	1	82	1, 2
52	2	83	2
53	2	84	2
54	2, 5	85	4
55	3	86	3
56	1	87	1
57	3	88	1
58	2	89	2
59	2	90	2
60	2	91	3
61	2	92	3
62	1, 2, 4	93	3
63	3, 4	94	1, 2
64	1	95	2
65	4	96	1
66	4	97	3
67	1	98	1
68	1, 4, 5	99	1
69	3	100	2
70	1, 2	101	1
71	1	102	1
72	3	103	4
73	3	104	1
74	2	105	1
75	1	106	1
76	1, 2	107	1
77	1		

---

---

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Артемьева, С. А.* Микробиологический контроль мяса животных, птиц, яиц и продуктов их переработки : справочник / С. А. Артемьева [и др.]. — М. : КолосС, 2002.
2. *Асонов, Н. Р.* Микробиология. — М. : Колос, 2002.
3. *Автономов, И.* Технология приготовления сенажа. — М. : Колос, 1968.
4. *Болотников, И. А.* Словарь иммунологических терминов. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Росагропромиздат, 1991.
5. Ветеринарно-санитарная экспертиза, стандартизация и сертификация продуктов / под ред. К. Е. Елемесова, Н. Ф. Шуклина. — Алма-Ата : Издательский дом «Средо», 2002. — Т. 1, 2.
6. *Госманов, Р. Г.* Ветеринарная микробиология и иммунология / Р. Г. Госманов, Н. М. Кольчев. — М. : КолосС, 2003.
7. *Госманов, Р. Г.* Общая и специальная микробиология / Р. Г. Госманов, А. И. Ибрагимова. — Казань, 2004.
8. *Госманов, Р. Г.* Практикум по общей и специальной микробиологии / Р. Г. Госманов, А. И. Ибрагимова. — Казань, 2004.
9. *Калина, Г. П.* Энтерококки // Методы санитарно-бактериологических исследований внешней среды. — М. : Медицина, 1966. — С. 53.
10. *Калина, Г. П.* Рациональная классификация БГКП в санитарно-показательном аспекте // Гигиена и санитария. — 1968. — № 5. — С. 95–98.
11. *Калина, Г. П.* Энтерококки / Г. П. Калина, А. П. Калина // Санитарная микробиология. — М. : Медицина, 1969. — С. 59–75.
12. *Костенко, Т. С.* Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т. С. Костенко [и др.]. — М. : КолосС, 2001.

13. *Кочемасова, З. Н.* Санитарная микробиология и вирусология / З. Н. Кочемасова [и др.]. — М. : Медицина, 1987.
14. *Красникова, Л. В.* Бифидобактерии и использование их в молочной промышленности / Л. В. Красникова [и др.]. — М. : АгроНИИТЭИ, 1992.
15. *Крупина, А. П.* Дифференциация стрептококков, встречающихся в пищевых продуктах // Лаб. дело. — 1963. — № 1. — С. 47–48.
16. *Кольчев, Н. М.* Ветеринарная микробиология и иммунология / Н. М. Кольчев, Р. Г. Госманов. — М. : КолосС, 2003.
17. *Макаров, В. И.* Основы инфекционной иммунологии / В. И. Макаров [и др.]. — Владимир ; М. : Фолиант, 2000.
18. *Макарецв, Н. Г.* Кормление сельскохозяйственных животных. — Калуга : Облиздат, 1999.
19. *Мишустин, Е. Н.* Микробиология / Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев. — М. : КолосС, 1987.
20. *Панин, А. Н.* Иммунология и кишечная микрофлора / А. Н. Панин [и др.]. — М. : Аграрная наука ; ИК «Родник», 1998.
21. Санитарная микробиология / под ред. С. Я. Любашенко. — М. : Пищевая промышленность, 1980.
22. *Сидоров, М. А.* Нормальная микрофлора животных и ее селекция пробиотиками / М. А. Сидоров [и др.] // Ветеринария. — 2000. — № 11.
23. *Тепнер, Е. З.* Практикум по микробиологии / Е. З. Тепнер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. — М. : КолосС, 1993.

---

---

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений .....	3
Введение .....	5

## РАЗДЕЛ I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

<b>Глава 1. Предмет, задачи и этапы развития микробиологии ....</b>	<b>9</b>
1.1. Принципы классификации микроорганизмов ....	12
1.2. Морфология и строение бактериальной клетки .....	14
1.2.1. Строение бактериальной клетки .....	16
1.3. Особенности морфологии и строения других групп микроорганизмов .....	19
1.3.1. Актиномицеты .....	19
1.3.2. Риккетсии и хламидии .....	20
1.3.3. Микоплазмы .....	22
1.3.4. Морфология и строение микроскопических грибов .....	22
1.3.5. Дрожжи .....	28
1.3.6. Вирусы .....	35
1.3.7. Фаги .....	36
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>36</i>
<b>Глава 2. Физиология микроорганизмов .....</b>	<b>38</b>
2.1. Химический состав .....	38
2.2. Метаболизм .....	42
2.3. Типы питания микробов .....	44
2.4. Дыхание .....	45
2.5. Рост и размножение бактерий .....	47
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>50</i>

<b>Глава 3. Генетика микроорганизмов</b> .....	51
3.1. Наследственность и изменчивость микроорганизмов .....	52
3.1.1. Формы изменчивости микроорганизмов .....	53
3.1.2. Мутации .....	54
<i>Контрольные вопросы</i> .....	57
<b>Глава 4. Превращения микроорганизмами соединений азота, углерода, фосфора, серы, железа и других элементов</b> .....	58
4.1. Круговорот азота .....	58
4.1.1. Фиксация атмосферного азота .....	59
4.1.2. Аммонификация белков .....	61
4.1.3. Аммонификация мочевины .....	62
4.1.4. Нитрификация .....	62
4.1.5. Денитрификация.....	63
4.2. Круговорот углерода .....	63
4.2.1. Разложение пектиновых веществ.....	65
4.2.2. Спиртовое брожение .....	66
4.2.3. Молочнокислое брожение .....	67
4.2.4. Пропионовокислое брожение .....	69
4.2.5. Маслянокислое брожение .....	70
4.2.6. Уксуснокислое брожение.....	70
4.3. Превращение микроорганизмами фосфора, железа и серы .....	71
4.3.1. Фосфор .....	71
4.3.2. Железо .....	72
4.3.3. Сера.....	72
<i>Контрольные вопросы</i> .....	73
<b>Глава 5. Действие факторов внешней среды на микроорганизмы</b> .....	74
5.1. Действие физических факторов .....	74
5.1.1. Влияние на микроорганизмы высоких температур.....	75
5.1.2. Влияние на микроорганизмы низких температур и их практическое использование .....	77
5.1.3. Влияние высушивания.....	78
5.1.4. Токи сверхвысокой частоты .....	79
5.1.5. Действие различных видов излучения на микроорганизмы.....	80
5.1.6. Влияние ультразвука .....	81

5.2. Действие химических веществ .....	81
5.3. Действие биологических факторов .....	82
5.3.1. Антибиотики .....	83
5.3.2. Бактериофаги .....	88
<i>Контрольные вопросы</i> .....	89
<b>Глава 6.</b> Микробиология воды и воздуха .....	90
6.1. Микрофлора воды .....	90
6.2. Микрофлора воздуха .....	93
<i>Контрольные вопросы</i> .....	96
<b>Глава 7.</b> Микрофлора организма животных .....	97
<i>Контрольные вопросы</i> .....	104
<b>Глава 8.</b> Почвенные микроорганизмы: качественный и количественный состав, их роль в плодородии почвы .....	105
8.1. Роль почвенных микроорганизмов в плодородии почвы. Влияние обработки почвы, внесения навоза и минеральных удобрений на деятельность микроорганизмов .....	113
8.1.1. Микробиология навоза .....	115
8.1.2. Роль микроорганизмов в почвообразовании и поддержании почвенного плодородия .....	119
<i>Контрольные вопросы</i> .....	122
<b>Глава 9.</b> Микрофлора плодов, овощей и продуктов их переработки .....	123
9.1. Микробиологические процессы порчи плодов и овощей .....	126
9.1.1. Микробиологическая характеристика плодов и овощей .....	127
9.2. Основные принципы сохранения плодоовощной продукции .....	132
9.2.1. Влияние способов консервирования на качество, пищевую ценность и сохранение плодоовощной продукции .....	133
9.3. Микробиология бродильных процессов .....	135
9.3.1. Технология пивоварения .....	135
9.3.2. Микробиологические основы виноделия .....	143
9.3.3. Микробиологические процессы при приготовлении пищевого уксуса .....	152

9.4. Микробиологические процессы при приготовлении квашеной капусты и огурцов.....	155
9.5. Микробиологические процессы при хлебопечении .....	158
9.5.1. Микроорганизмы, вызывающие болезни хлеба .....	161
<i>Контрольные вопросы</i> .....	164
<b>Глава 10.</b> Учение об инфекции и иммунитете. Возбудители бактериальных, грибковых и вирусных инфекций .....	165
10.1. Роль макроорганизма и условий среды в возникновении и развитии инфекционного процесса .....	168
10.2. Учение об иммунитете .....	169
10.3. Возбудители бактериальных, грибковых и вирусных инфекций .....	173
10.3.1. Микроорганизмы — возбудители дерматомикозов .....	181
10.3.2. Возбудители микотоксикозов .....	183
10.3.3. Микроорганизмы — возбудители вирусных инфекций .....	184
10.4. Технология производства биопрепаратов сельскохозяйственного назначения (лечебно-профилактические и диагностические препараты, пробиотики, ферменты, антибиотики) .....	188
10.4.1. Технология производства пробиотиков .....	192
10.4.2. Технология производства ферментных препаратов и выращивание плесневых грибов для пищевой промышленности... ..	201
<i>Контрольные вопросы</i> .....	204
<b>Глава 11.</b> Микрофлора пищевых продуктов .....	205
11.1. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАнМ).....	206
11.2. Возбудители пищевых отравлений.....	208
11.3. Возбудители пищевых токсикозов .....	215
<i>Контрольные вопросы</i> .....	220

<b>Глава 12. Микробиология мяса, мясных продуктов и яиц. Контроль их производства .....</b>	<b>221</b>
12.1. Микробиология мяса и мясных продуктов .....	221
12.1.1. Изменение микрофлоры мяса при холодильном хранении.....	223
12.1.2. Консервирование мяса .....	227
12.2. Микробиология яиц и яичных продуктов .....	231
12.2.1. Инфекции, передаваемые через яйцо .....	233
12.2.2. Хранение яиц .....	234
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>236</i>
<b>Глава 13. Микробиология молока и молочных продуктов. Контроль их производства .....</b>	<b>237</b>
13.1. Микрофлора молока и источники его загрязнения .....	238
13.1.1. Происхождение микрофлоры молока. Источники загрязнения .....	238
13.1.2. Микрофлора, получаемая молоком из вымени .....	238
13.1.3. Изменение микрофлоры молока при хранении и транспортировке .....	240
13.1.4. Нормальная микрофлора молока.....	242
13.2. Пороки молока микробного происхождения .....	242
13.3. Возбудители инфекционных болезней, передаваемых через молоко.....	243
13.4. Сохранение молока физическими методами .....	244
13.5. Санитарно-микробиологическая характеристика молока .....	247
13.6. Микробиология молочных продуктов .....	251
13.6.1. Продукты молочнокислого брожения .....	253
13.6.2. Продукты смешанного брожения .....	254
13.7. Микробиология масла.....	257
13.7.1. Микробиологические процессы при хранении масла и его пороки .....	258
13.8. Микробиология сыроделия .....	259
13.8.1. Пороки сыров микробного происхождения .....	263
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>264</i>
<b>Глава 14. Технология производства кормов .....</b>	<b>265</b>
14.1. Эпифитная микрофлора растений .....	265
14.2. Сено .....	267

14.3. Микробиология силосования кормов .....	268
14.3.1. Биохимизм микробиологических процессов при силосовании .....	270
14.4. Сенаж .....	272
14.5. Возбудители порчи кормов .....	275
14.6. Дрожжевание кормов .....	276
<i>Контрольные вопросы</i> .....	278
<b>Глава 15.</b> Микрофлора кожевенно-мехового сырья .....	279
15.1. Микрофлора парной шкуры .....	279
15.2. Консервирование кожевенного сырья .....	280
15.3. Микрофлора шерсти .....	281
<i>Контрольные вопросы</i> .....	282
<b>Глава 16.</b> Переработка отходов сельского хозяйства .....	283
<i>Контрольные вопросы</i> .....	286

## РАЗДЕЛ II. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ

<b>Тема 1.</b> Микробиологическая лаборатория .....	289
1.1. Световой микроскоп, его устройство и правила работы .....	291
1.2. Основные формы бактерий .....	295
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	296
<i>Контрольные вопросы</i> .....	296
<b>Тема 2.</b> Бактериологические краски .....	298
2.1. Виды бактериологических красок .....	299
2.2. Простой метод окрашивания .....	301
2.3. Сложные методы окрашивания .....	302
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	303
<i>Контрольные вопросы</i> .....	304
<b>Тема 3.</b> Биологическое значение образования спор и капсул. Методы окрашивания спор и капсул .....	305
3.1. Биологическое значение образования спор .....	306
3.2. Биологическое значение образования капсул .....	307
3.3. Исследование бактерий на подвижность .....	308
3.3.1. Методика определения подвижности бактерий в препаратах «висячая капля» и «раздавленная капля» .....	309
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	310
<i>Контрольные вопросы</i> .....	310

<b>Тема 4. Приготовление питательных сред для выращивания микроорганизмов.</b>	
Методы стерилизации.....	312
<b>4.1. Характеристика и классификация питательных сред .....</b>	<b>313</b>
4.1.1. Обычные питательные среды.....	314
4.1.2. Специальные питательные среды.....	316
4.1.3. Дифференциально-диагностические среды..	317
4.1.4. Селективные среды.....	319
<b>4.2. Методы стерилизации питательных сред и посуды .....</b>	<b>324</b>
4.2.1. Физические методы стерилизации .....	324
4.2.2. Химические методы.....	327
4.2.3. Механические методы.....	328
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>329</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>330</i>
<b>Тема 5. Методы культивирования аэробных микроорганизмов.....</b>	<b>331</b>
5.1. Техника посева бактерий на питательные среды... 331	
5.2. Методы культивирования бактерий.....	333
5.3. Методы выделения чистых культур бактерий ... 335	
5.3.1. Механические методы.....	335
5.3.2. Биологические методы.....	336
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>337</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>338</i>
<b>Тема 6. Методы культивирования анаэробных микроорганизмов.....</b>	<b>339</b>
6.1. Методы создания анаэробноза.....	340
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>344</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>345</i>
<b>Тема 7. Культуральные свойства бактерий .....</b>	<b>346</b>
7.1. Культуральные свойства бактерий на плотных питательных средах.....	347
7.2. Культуральные свойства бактерий в жидких питательных средах.....	348
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>348</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>349</i>

<b>Тема 8. Ферментативные (биохимические) свойства бактерий</b> .....	350
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	354
<i>Контрольные вопросы</i> .....	354
<b>Тема 9. Микроскопические грибы — плесневые грибы и дрожжи</b> .....	356
9.1. Морфологические особенности некоторых низших и высших грибов.....	358
9.2. Особенности культивирования плесневых грибов.....	360
9.3. Особенности изучения морфологии плесневых грибов .....	361
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	362
<i>Контрольные вопросы</i> .....	362
<b>Тема 10. Серологические методы диагностики инфекционных болезней</b> .....	363
10.1. Методика постановки реакции преципитации... 365	
10.1.1. Методика постановки РП методом наслаивания .....	367
10.2. Методика постановки РА на предметном стекле .....	368
10.2.1. Капельный метод РА на предметном стекле .....	370
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	371
<i>Контрольные вопросы</i> .....	372
<b>Тема 11. Принцип приготовления биопрепаратов. Вакцины, гипериммунные сыворотки и контроль качества</b> .....	373
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	378
<i>Контрольные вопросы</i> .....	378
<b>Тема 12. Санитарно-микробиологическая лаборатория и ее оборудование. Техника безопасности и режим работы. Микробиологическое исследование воздуха</b> .....	379
12.1. Санитарно-микробиологическая лаборатория и ее оборудование .....	380

12.1.1. Правила и режим работы .....	381
12.2. Санитарно-микробиологическое исследование воздуха .....	382
12.2.1. Седиментационный метод Коха.....	383
12.2.2. Аспирационный метод Кротова.....	384
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>385</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>385</i>
<b>Тема 13. Санитарно-микробиологическое исследование     почвы .....</b>	<b>386</b>
13.1. Определение МАФАНМ в 1 г почвы методом серийных разведений.....	388
13.2. Определение коли-титра почвы методом броидильных проб.....	389
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>390</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>391</i>
<b>Тема 14. Санитарно-микробиологическое исследование     воды .....</b>	<b>392</b>
14.1. Определение коли-титра и коли-индекса воды .....	394
14.1.1. Метод броидильных проб .....	395
14.1.2. Метод мембранных фильтров.....	398
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>401</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>401</i>
<b>Тема 15. Микробиологический контроль технологического     процесса производства мяса животных.....</b>	<b>402</b>
15.1. Отбор проб.....	404
15.2. Обеззараживание условно годного мяса.....	412
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>413</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>413</i>
<b>Тема 16. Микробиологический контроль технологического     процесса производства мяса кур.....</b>	<b>414</b>
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>421</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>422</i>
<b>Тема 17. Микробиологический контроль технологического     процесса производства мясных консервов .....</b>	<b>423</b>
17.1. Отбор проб.....	426
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>435</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>436</i>

<b>Тема 18.</b> Микробиологический контроль технологического процесса производства колбасных изделий .....	437
18.1. Отбор, подготовка проб и проведение исследования .....	438
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	447
<i>Контрольные вопросы</i> .....	447
<b>Тема 19.</b> Микробиологический контроль технологического процесса производства яиц и яйцепродуктов .....	448
19.1. Исследование поверхности скорлупы яиц .....	449
19.2. Исследование содержимого яйца .....	450
19.3. Микробиологическое исследование яичных продуктов .....	453
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	455
<i>Контрольные вопросы</i> .....	455
<b>Тема 20.</b> Микробиологический контроль технологического процесса производства рыбы и морепродуктов .....	456
20.1. Контроль качества свежей, охлажденной, мороженой рыбы и морских беспозвоночных ...	456
20.2. Морепродукты .....	465
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	466
<i>Контрольные вопросы</i> .....	467
<b>Тема 21.</b> Микробиологический контроль технологического процесса производства молока. Показатели сорта молока .....	468
21.1. Индикация ингибиторов в молоке .....	469
21.1.1. Бактериологическое исследование молока .....	469
21.1.2. Кислотность молока .....	470
21.1.3. Определение степени чистоты .....	471
21.1.4. Проба на редуктазу .....	471
21.2. Определение ингибирующих веществ в молоке .....	473
21.3. Определение эффективности пастеризации ...	474
21.4. Определение коли-титра молока .....	476
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	480
<i>Контрольные вопросы</i> .....	480
<b>Тема 22.</b> Микробиологический контроль технологического процесса производства кисломолочных продуктов .....	481

22.1. Технология производства кисломолочных продуктов .....	482
22.2. Продукты молочнокислого брожения.....	484
22.2.1. Ацидофильное молоко .....	484
22.2.2. Технология приготовления сметаны .....	485
22.2.3. Технология приготовления домашней простокваши .....	485
22.3. Продукты комбинированного брожения .....	486
22.3.1. Технология приготовления кефира.....	486
22.3.2. Технология приготовления кумыса .....	487
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	488
<i>Контрольные вопросы</i> .....	488
<b>Тема 23.</b> Микробиологический контроль технологического процесса производства сливочного масла .....	489
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	493
<i>Контрольные вопросы</i> .....	493
<b>Тема 24.</b> Микробиологический контроль технологического процесса производства сыра.....	494
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	497
<i>Контрольные вопросы</i> .....	498
<b>Тема 25.</b> Микробиологический контроль качества дрожжевой закваски.....	499
25.1. Морфология .....	499
25.1.1. Определение числа клеток, содержащих гликоген .....	501
25.1.2. Выявление волютиновых гранул в клетках дрожжей.....	501
25.2. Определение наличия посторонней микрофлоры .....	502
25.2.1. Микроскопические методы.....	502
25.2.2. Бактериологические методы.....	503
25.3. Определение подъемной силы дрожжей.....	505
<i>Задания для самостоятельной работы</i> .....	505
<i>Контрольные вопросы</i> .....	506
<b>Тема 26.</b> Микробиологический контроль технологического процесса переработки зерна, муки и хлебных продуктов .....	507
26.1. Микрофлора муки .....	508

26.2. Болезни хлеба.....	510
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>512</i>
<i>Контрольные вопросы .....</i>	<i>513</i>
<b>Терминологический словарь .....</b>	<b>514</b>
<b>Тестовые задания .....</b>	<b>527</b>
<b>Ответы на тестовые задания.....</b>	<b>544</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>546</b>

*Рауис Госманович ГОСМАНОВ,  
Николай Матвеевич КОЛЫЧЕВ,  
Галимзян Фазылзянович КАБИРОВ,  
Альберт Камилевич ГАЛИУЛЛИН*

## **САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

*Учебное пособие*

Издание второе, исправленное

Зав. редакцией литературы по пищевой биотехнологии  
и технологии продуктов питания *М. В. Гончаренко*  
Ответственный редактор *С. В. Макаров*  
Корректор *Т. А. Кошелева*  
Подготовка иллюстраций *А. П. Маркова*  
Верстка *Е. Г. Фортина*  
Выпускающие *Т. С. Симонова, Е. П. Королькова*

ЛР № 065466 от 21.10.97  
Гигиенический сертификат 78.01.07.953.П.007216.04.10  
от 21.04.2010 г., выдан ЦГСЭН в СПб

**Издательство «ЛАНЬ»**

lan@lanbook.ru; www.lanbook.com  
192029, Санкт-Петербург, Общественный пер., 5.  
Тел./факс: (812) 412-29-35, 412-05-97, 412-92-72.  
Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

### **ГДЕ КУПИТЬ**

**по России и зарубежью**

«ЛАНЬ-ТРЕЙД». 192029, Санкт-Петербург, ул. Крупской, 13  
тел.: (812) 412-85-78, 412-14-45, 412-85-82; тел./факс: (812) 412-54-93  
e-mail: trade@lanbook.ru; ICQ: 446-869-967; www.lanpbl.spb.ru/price.htm

**в Москве и в Московской области**

«ЛАНЬ-ПРЕСС». 109263, Москва, 7-я ул. Текстильщиков, д. 6/19  
тел.: (499) 178-65-85; e-mail: lanpress@lanbook.ru

**в Краснодаре и в Краснодарском крае**

«ЛАНЬ-ЮГ». 350901, Краснодар, ул. Жлобы, д. 1/1  
тел.: (861) 274-10-35; e-mail: lankrd98@mail.ru

**ДЛЯ РОЗНИЧНЫХ ПОКУПАТЕЛЕЙ:**

*интернет-магазины:*

**Издательство «Лань»:** <http://www.lanbook.com>  
«Сова»: <http://www.symplex.ru>; «Ozon.ru»: <http://www.ozon.ru>  
«Библион»: <http://www.biblion.ru>

Подписано в печать 07.11.14.

Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 84×108<sup>1/32</sup>.  
Печать офсетная. Усл. п. л. 29,40. Тираж 1000 экз.

Заказ № .

Отпечатано в полном соответствии  
с качеством предоставленных диапозитивов  
в ОАО «Издательско-полиграфическое предприятие «Правда Севера».  
163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, д. 32.  
Тел./факс (8182) 64-14-54, www.ippps.ru