

Министерство сельского хозяйства РФ
ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет»

Инженерно-технологический институт
Кафедра технологического оборудования животноводства
и перерабатывающих производств

МИКРОБИОЛОГИЯ

учебно-методическое пособие
для проведения лабораторно-практических занятий и
самостоятельной работы студентами направления подготовки
19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания
профиль Технология продуктов общественного питания



Брянская область, 2018

УДК 579 (076)

ББК 28.4

Р 98

Рябичева, А. Е. **Микробиология:** учебно-методическое пособие для проведения лабораторно-практических занятий и самостоятельной работы студентами направления подготовки 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания профиль Технология продуктов общественного питания / А. Е. Рябичева, Х. М. Исаев. – Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2018. - 182 с.

Учебно-методическое пособие для проведения лабораторно-практических занятий и самостоятельной работы подготовлено в соответствии с типовой учебной программой по изучению дисциплины и самостоятельной работы направления подготовки 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания профиль Технология продуктов общественного питания.

В результате изучения дисциплины реализуются следующие компетенции: ОПК-3; ПК-1.

Рецензент: кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры технологического оборудования животноводства и перерабатывающих производств Слезко Е.И.

Рекомендовано к изданию решением методической комиссии инженерно-технологического института «Брянского ГАУ» от 21 марта 2018 года протокол № 8.

© Брянский ГАУ, 2018

© Рябичева А.Е., 2018

© Исаев Х.М., 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Тема 1. Правила работы и оборудование микробиологической лаборатории. Изучение устройства микроскопа и правила работы с ним. Методы исследований, применяемые в микробиологической практике.	6
Тема 2. Систематика микроорганизмов. Морфология палочковидных, кокков и извитых	15
Тема 3. Морфология риккетсий, хламидий, микоплазм, грибов	21
Тема 4. Строение бактериальной клетки	29
Тема 5. Методы приготовления препаратов микроорганизмов. Приготовление красителей. Методы окрашивания микроорганизмов	37
Тема 6. Питательные среды. Техника посева микробов. Культивирование и рост микроорганизмов	47
Тема 7. Культуральные и биохимические свойства микроорганизмов	58
Тема 8. Методы выделения чистой культуры аэробных и анаэробных микроорганизмов. Принципы идентификации	66
Тема 9. Методы стерилизации. Общая характеристика противомикробных средств	74
Тема 10. Санитарно-микробиологическое исследование почвы, воды, воздуха	79
Тема 11. Санитарно-микробиологическое исследование молока, масла.	95
Тема 12. Санитарно-микробиологическое исследование кисломолочных продуктов.	105
Тема 13. Санитарно-микробиологическое исследование сыров, молочных консервов, мороженого.	108
Тема 14. Санитарно-микробиологическое исследование мяса и мясопродуктов	113
Тема 15. Микробиологическое исследование колбасных изделий и мясных консервов	122
Тема 16. Санитарно-микробиологическое исследование яиц	132
Тема 17. Санитарно-микробиологическое исследование рыбы и рыбных продуктов.	137
Тема 18. Микробиологический контроль качества производственных дрожжей	145
Тема 19. Микробиология пива, вина, безалкогольных напитков	158
Тема 20. Микробиология специй и пряностей	162
Тема 21. Микробиология кондитерских изделий	163
Тема 22. Микробиология кулинарных изделий	166
Тема 23. Микробиология яичных продуктов	168
Тема 24. Микробиология морепродуктов	170
Тема 25. Микробиология зерновых продуктов	175
Список использованной литературы	181

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

1. АТФ - аденозинтрифосфат
2. БББ - бокс биологической безопасности
3. РНК - рибонуклеиновая кислота
4. ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
5. ЦПМ - цитоплазматическая мембрана
6. МПА - мясо-пептонный агар
7. МПБ - мясо-пептонный бульон
8. МПЖ - мясо-пептонный желатин
9. МППБ - мясо-пептонный печеночный бульон
10. МФА - метод флюоресцирующих антител
11. БГКП - бактерии группы кишечной палочки
12. ТКБ - термотолерантные колиформные бактерии
13. НДРФ – научная документация Российской Федерации
14. ОКБ – общие колиформные бактерии
15. ТКБ - термотолерантные колиформные бактерии
16. ГПС – глюкозо-пептонная среда
17. КМАФАиМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов
18. КОЕ - колониеобразующие единицы
19. «ХБ» - хинозол-бромкрезолпурпурная среда
20. ЖСА - желточно-солевой агар
21. БББ - бокс биологической безопасности
22. НТД – научно-техническая документация
23. ГОСТ - государственный стандарт

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология (от греч. micros -малый, bios - жизнь, logos - учение) - наука, изучающая строение, жизнедеятельность и экологию микроорганизмов - мельчайших форм жизни растительного или животного происхождения, невидимых невооруженным глазом.

Общая микробиология изучает закономерности строения и жизнедеятельности микроорганизмов на всех уровнях: молекулярном, клеточном, популяционном; генетику и взаимоотношения их с окружающей средой.

Целями изучения дисциплины является получение фундаментального образования, способствующего развитию личности;

формирование понимания роли фундаментальной подготовки в усвоении дисциплин естественнонаучного цикла для дальнейшей профессиональной деятельности.

Задачами дисциплины являются:

- формирование целостного представления о теоретических основах общей микробиологии;
- строении, физиологии, разнообразии, распространении микроорганизмов;
- их роли в отдельных отраслях промышленности, методами их контроля и прогнозирования;
- приобретении навыков необходимых для профессиональной деятельности.

ТЕМА 1
ПРАВИЛА РАБОТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ. ИЗУЧЕНИЕ
УСТРОЙСТВА МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НИМ.
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ
В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Правила работы в микробиологической лаборатории

Специфика работы в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения порядка и чистоты. В связи с этим при работе в лаборатории необходимо соблюдать следующие правила.

1. Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде, головном уборе, вносить посторонние вещи.

2. Запрещается находиться в лаборатории в период обработки воздуха помещения ультрафиолетовыми лампами.

3. Перед занятиями необходимо надеть хлопчатобумажный халат и шапочку (или косынку).

4. Не разрешается выходить в халате за пределы лаборатории и надевать на халат верхнюю одежду.

5. Нельзя класть на лабораторный стол личные вещи (сумки, папки и др.), их следует держать на специально отведенных местах.

6. В лаборатории запрещается принимать пищу, пить воду, не допускаются излишние разговоры и хождения.

7. На лабораторном столе не должно быть никаких лишних предметов, не имеющих отношения к работе.

8. Соблюдать осторожность при работе с открытым огнем спиртовки или газовой горелки.

9. Во избежание распыления спор микроорганизмов не допускается оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами плесневых грибов, часто являющихся аллергенами.

10. Суспензии микроорганизмов набирают только с помощью груши или дозирующего устройства.

11. Перед использованием лабораторной посуды, пипеток, оборудования проверить целостность и исправность.

12. Использованные пипетки, предметные и покровные стекла следует опускать в раствор с дезинфицирующей жидкостью.

13. В конце занятий следует привести в порядок рабочее место:

– засеянные чашки Петри или пробирки, культуры микроорганизмов сдать лаборанту;

– снять масло с иммерсионного объектива микроскопа фильтровальной бумагой, смоченной бензином, с помощью револьверной

насадки установить над столиком объектив 8х, подложить под него мягкую ткань и поставить микроскоп на место;

– вымыть посуду, протереть рабочий стол дезинфицирующим средством (70% р-р спирта).

14. Дежурному по группе следует проверить рабочие места студентов.

Оборудование микробиологической лаборатории

Микробиологическая лаборатория должна включать следующие помещения:

- лабораторные комнаты для проведения исследований;
- застекленный ламинарный бокс для выполнения работ, требующих соблюдения повышенной стерильности;
- моечную, оборудованную для мытья посуды;
- препараторскую, приспособленную для приготовления питательных сред, подготовки посуды для стерилизации, приготовления реактивов;
- отделение для стерилизации, в котором установлены автоклавы.

Все помещения лаборатории должны иметь хорошее естественное и искусственное освещение. Поверхность столов и полы покрывают легко моющимся материалом (пластик, линолеум); в боксе, автоклавной и моечной стены и полы покрывают плиткой. Для стерилизации воздуха в помещениях лаборатории устанавливают бактерицидные лампы (БУВ-15, БУВ-30 и др.).

Требования к действиям при ликвидации аварий во время работы с биологическим материалом

1. При каждой организации, проводящей работу с возбудителями I-II групп патогенности, должен быть изолятор для сотрудников на случай обнаружения у них симптомов вероятных на заболевание и допустивших аварию.

2. В изоляторе предусматривается запас основных и резервных специфических лекарственных препаратов, медикаментов для оказания помощи по жизненным показаниям (кардиологических, противошоковых, антидотов) и дезинфицирующих средств.

3. При авариях во время работы с инфекционным материалом, работу немедленно прекращают и включают аварийную сигнализацию.

4. В случае возникновения аварии с разбрызгиванием инфекционного материала, вся проводящаяся работа в комнате прекращается. Защитную одежду (начиная с косынки или шлема) погружают в дез-

инфицирующий раствор или помещают в бикс (бак) для автоклавирования. В глаза, нос закапывают растворы антибиотиков, к которым чувствителен возбудитель. В случае аварии, при работе с возбудителями глубоких микозов, в глаза и нос закапывают 1 % борную кислоту, рот и горло прополаскивают 70% этиловым спиртом.

5. При аварии с ботулиническим токсином глаза и рот промывают водой и антитоксической сывороткой, разведенной до 10 международных единиц в 1 миллилитре. При попадании ботулинического токсина на открытые участки кожи смывают его большим количеством воды с мылом.

6. Если авария произошла при работе с неизвестным возбудителем, проводится профилактическое лечение антибиотиками широкого спектра действия.

7. Если авария произошла без разбрызгивания биологического материала, накладывают тампон (салфетку) с дезинфицирующим раствором на место соприкосновения биологического материала с поверхностью оборудования.

8. Если авария произошла в боксе (или БББ) – прекращают работу, на место попадания материала накладывают салфетки, обильно смоченные дезинфицирующим раствором. В боксе включают на 30 минут бактерицидные облучатели, включают аварийную сигнализацию, затем проводят дезинфекцию. Вытяжная вентиляция во время аварии и дезинфекции должна оставаться включенной.

9. Если авария связана с ранением или другим нарушением целостности кожных покровов:

1) работу прекращают, руки обрабатывают дезинфицирующим раствором, снимают перчатку и выдавливают из ранки кровь в дезинфицирующий раствор, на место ранения ставят на 4-5 минут компресс из дезинфицирующего раствора или 70% р-м этилового спирта;

2) при работе с возбудителем сибирской язвы место ранения тщательно промывают водой с мылом и смазывают йодом, без применения дезинфицирующих растворов;

3) при аварии с возбудителями глубоких микозов место ранения обрабатывают соответствующим дезинфицирующим раствором, моют водой с мылом, смазывают йодом;

4) при работе с вирусами I-II групп патогенности, кровь выдавливают в сухую стерильную салфетку и обрабатывают рану йодом без применения дезинфицирующего раствора;

5) при работе с ВИЧ после обработки раны и слизистых, пострадавшему не позднее 72 часов назначается профилактическая антиретровирусная терапия (АРВТ) и устанавливается наблюдение в теч-

ние 12 месяцев после несчастного случая. Пострадавший должен быть предупрежден, что он может послужить источником инфекции. В случае отрицательных анализов на ВИЧ через 6 недель, 12 недель, 6 месяцев и 1 год после несчастного случая наблюдение прекращают.

10. Если авария произошла при транспортировке материала (в автоклавную и между подразделениями), персонал, оставив на местах переносимые емкости, покидает опасную зону и сообщает о случившемся руководителю подразделения. Лица, допустившие аварию, проходят санитарную обработку. Обработка помещения при аварии должна проводиться в противочумном костюме 1-типа.

11. Обо всех случаях лабораторного заражения микроорганизмами I-IV групп патогенности информация должна немедленно предоставляться в государственный уполномоченный орган в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Устройство микроскопа и правила работы с ним

Изучение клеток микроорганизмов, невидимых невооруженным глазом, возможно только при помощи микроскопов. Эти приборы позволяют получать изображение исследуемых объектов, увеличенное в сотни раз (световые микроскопы), в десятки и сотни тысяч раз (электронные микроскопы).

Биологический микроскоп называется световым, так как он обеспечивает возможность изучать объект в проходящем свете в светлом и темном поле зрения.

Основными элементами современных световых микроскопов являются механическая и оптическая части (рис. 1).

К механической части относятся штатив, тубус, револьверная насадка, коробка микромеханизма, предметный столик, макрометрический и микрометрический винты.

Штатив состоит из двух частей: основания и тубусодержателя (колонки). **Основание** микроскопа прямоугольной формы имеет снизу четыре опорные площадки, что обеспечивает устойчивое положение микроскопа на поверхности рабочего стола. **Тубусодержатель** соединяется с основанием и может перемещаться в вертикальной плоскости при помощи макро- и микрометрического винтов. При вращении винтов по часовой стрелке тубусодержатель опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается от препарата. В верхней части тубусодержателя укреплена **головка** с гнездом для монокулярной (или бинокулярной) насадки и направляющей для револьверной насадки. Головка крепится **винтом**.

Тубус – это труба микроскопа, позволяющая поддерживать определенное расстояние между основными оптическими деталями – окуляром и объективом. Вверху в тубус вставляется окуляр. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус.

Револьверная насадка представляет собой вогнутый диск с несколькими гнездами, в которые ввинчиваются 3–4 объектива. Вращая револьверную насадку, можно быстро установить любой объектив в рабочее положение под отверстие тубуса.

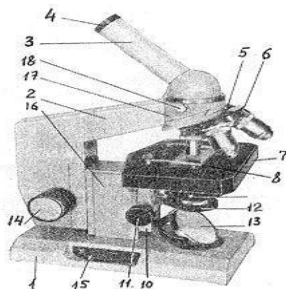


Рис. 1. Устройство микроскопа:

*1 – основание; 2 – тубусодержатель; 3 – тубус; 4 – окуляр;
5 – револьверная насадка; 6 – объектив; 7 – предметный столик;
8 – клеммы, прижимающие препарат; 9 – конденсор; 10 – кронштейн
конденсора; 11 – рукоятка перемещения конденсора; 12 – откидная линза;
13 – зеркало; 14 – макровинт; 15 – микровинт; 16 – коробка с механизмом
микрометрической фокусировки; 17 – головка для крепления тубуса
и револьверной насадки; 18 – винт для крепления головки*

Коробка микромеханизма несет с одной стороны направляющую для кронштейна конденсора, а с другой – направляющую для тубусодержателя. Внутри коробки находится механизм фокусировки микроскопа, представляющий собой систему зубчатых колес.

Предметный столик служит для размещения на нем препарата или другого объекта исследования. Столик может быть квадратным или круглым, подвижным или неподвижным. Подвижный столик перемещается в горизонтальной плоскости при помощи двух боковых винтов, что позволяет рассматривать препарат в разных полях зрения. На неподвижном столике для обследования объекта в разных полях зрения препарат перемещают рукой. В центре предметного столика имеется отверстие для освещения снизу лучами света, направляемыми от осветителя. На столике имеются две пружинные **клеммы**, предназначенные для закрепления препарата.

Некоторые системы микроскопов снабжены препаратоводителем,

необходимым при исследовании поверхности препарата или при подсчете клеток. Препаратоводитель позволяет производить передвижение препарата в двух взаимно-перпендикулярных направлениях. На препаратоводителе имеется система линеек – нониусов, с помощью которых можно присвоить координаты любой точке исследуемого объекта.

Макрометрический винт (макровинт) служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта. При вращении макровинта по часовой стрелке тубус микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки – поднимается.

Микрометрический винт (микровинт) используют для точной установки изображения объекта. Микрометрический винт является одной из наиболее легко повреждаемых частей микроскопа, поэтому с ним надо обращаться осторожно – не вращать с целью грубой установки изображения во избежание самопроизвольного опускания тубуса. При полном повороте микровинта тубус передвигается на 0,1 мм.

Оптическая часть микроскопа состоит из основных оптических деталей (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор).

Объективы (от лат. *objektum* – предмет) – наиболее важная, ценная и хрупкая часть микроскопа. Они представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу, на которой указаны степень увеличения и числовая апертура. Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной. Именно она обеспечивает увеличение. Остальные линзы называются коррекционными и служат для устранения недостатков оптического изображения, возникающих при рассмотрении исследуемого объекта.

Объективы бывают сухие и иммерсионные, или погружные. *Сухим* называется объектив, у которого между фронтальной линзой и рассматриваемым объектом находится воздух. Сухие объективы обычно имеют большое фокусное расстояние и увеличение 8х или 40х. *Иммерсионным* (погружным) называют объектив, у которого между фронтальной линзой и препаратом находится специальная жидкая среда. Вследствие разницы между показателями преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0) часть световых лучей преломляется и не попадает в глаз наблюдателя. В результате этого изображение получается нечетким, более мелкие структуры остаются невидимыми. Избежать рассеивания светового потока можно путем заполнения пространства между препаратом и фронтальной линзой объектива веществом, показатель преломления которого близок к коэффициенту преломления стекла. К таким веществам относятся глицерин (1,47), кедровое (1,51), касторовое (1,49), льняное (1,49), гвоздичное (1,53), анисовое масло

(1,55) и другие вещества. Иммерсионные объективы имеют на оправе обозначения: **I** (*immersion*) – иммерсия, **HI** (*homogen immersion*) – однородная иммерсия, **OI** (*oil immersion*) или **МИ** – масляная иммерсия. В настоящее время в качестве иммерсионной жидкости чаще используют синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу.

Объективы различают по их увеличению. Величина увеличения объективов обозначена на их оправе (8х, 40х, 60х, 90х). Кроме того, каждый объектив характеризуется определенной величиной рабочего расстояния. Для иммерсионного объектива это расстояние составляет 0,12 мм, для сухих объективов с увеличением 8х и 40х – 13,8 и 0,6 мм соответственно.

Окуляр (от лат. *okularis* – глазной) состоит из двух линз – глазной (верхней) и полевой (нижней), заключенных в металлическую оправу. Окуляр служит для увеличения изображения, которое дает объектив. Увеличение окуляра обозначено на его оправе. Существуют окуляры с рабочим увеличением от 4х до 15х.

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться бинокулярной насадкой. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах 55–75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около 1,5х) и коррекционные линзы.

Конденсор (от лат. *condenso* – уплотняю, сгущаю) состоит из двух-трех короткофокусных линз. Он собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. При помощи рукоятки, расположенной под предметным столиком, конденсор может перемещаться в вертикальной плоскости, что приводит к увеличению освещенности поля зрения при поднятом конденсоре и уменьшению его при опущенном конденсоре. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре имеется ирисовая (лепестковая) диафрагма, состоящая из стальных серповидных пластинок. При полностью открытой диафрагме рекомендуется рассматривать окрашенные препараты, при уменьшенном отверстии диафрагмы – неокрашенные. Под конденсором расположена **откидная линза** в оправе, используемая при работе с объективами малого увеличения, например, 8х или 9х.

Зеркало имеет две отражающие поверхности – плоскую и вогнутую. Оно закреплено на шарнирах в основании штатива и его можно легко поворачивать. При искусственном освещении рекомендуется пользоваться вогнутой стороной зеркала, при естественном – плоской.

Осветитель выполняет функцию искусственного источника света. Он состоит из низковольтной лампы накаливания, закрепляю-

щейся на штативе, и понижающего трансформатора. На корпусе трансформатора имеется рукоятка реостата, регулирующего накал лампы и тумблер для включения осветителя.

Во многих современных микроскопах осветитель вмонтирован в основание.

Правила работы с микроскопом

1. Микроскоп берут одной рукой за колонку штатива, а другой поддерживают за основание. Брать и поднимать микроскоп за другие детали категорически запрещается.

2. На рабочем столе микроскоп помещают колонкой к себе. Перед началом работы следует осторожно удалить пыль с оптических частей микроскопа мягкой сухой тканью, не касаясь пальцами линз.

3. С помощью револьверной насадки устанавливают нужный объектив. Характерный щелчок фиксатора внутри револьвера свидетельствует о центрированном положении объектива. Необходимо помнить, что чем меньше увеличение объектива, тем больше фокусное расстояние. При работе с объективом 8х расстояние между препаратом и объективом около 9 мм, с объективом 40х оно составляет 0,6 мм, и с объективом 90х – около 0, 15 мм.

4. На предметный столик помещают предметное стекло и закрепляют его клеммами.

5. Тубус микроскопа опускают вниз с помощью макрометрического винта осторожно, наблюдая за объективом сбоку, и приближают к препарату (не касаясь его) на расстояние, меньше рабочего. Затем, глядя в окуляр, медленным вращением макровинта поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого предмета.

6. Вращением микрометрического винта фокусируют объектив таким образом, чтобы изображение предмета было четким.

7. При работе с иммерсионным объективом на предметное стекло наносят каплю кедрового масла и, глядя сбоку на объектив, макрометрическим винтом осторожно опускают тубус так, чтобы фронтальная линза объектива погрузилась в масло. Затем, глядя в окуляр, медленным движением макровинта поднимают тубус до тех пор, пока не появится изображение. Для точной фокусировки пользуются микрометрическим винтом, который вращают в пределах одного оборота.

Внимание! Запрещается искать изображение препарата с помощью микрометрического винта.

8. Препарат рассматривают в нескольких полях зрения, пере-

двигая предметный столик при помощи боковых винтов, или перемещают его рукой на предметном столике. Находят наиболее подходящее поле зрения на участке препарата, на котором микроорганизмы видны отчетливо, в достаточном для просмотра количестве и зарисовывают микроскопическую картину.

9. При смене объективов следует регулировать интенсивность освещения рассматриваемого объекта. Желаемую степень освещения получают, опуская или поднимая конденсор.

10. По окончании работы поднимают тубус, снимают препарат с предметного столика, удаляют масло с фронтальной линзы иммерсионного объектива фильтровальной бумагой, смоченной бензином, устанавливают при помощи револьверной насадки объектив в увеличением 8х, кладут на предметный столик кусочек чистой марли и опускают тубус.

Методы исследований, применяемые в микробиологической практике

При изучении микроорганизмов применяют следующие методы лабораторной диагностики:

Микроскопический – основан на изучении микробов в препаратах - отпечатках из патологического материала или препаратах – мазках из чистых культур, обработанных простыми или сложными методами окраски с использованием светового, люминесцентного или электронного микроскопов. При этом описывают морфологические и тинкториальные свойства.

Бактериологический (микробиологический) – метод основан на проведении посевов микробов на искусственные обычные или специальные питательные среды с целью выделения чистой культуры и изучения ее свойств.

Биологический (биопроба) – основан на выявлении и изучении патогенных и токсигенных свойств у выделенных микробов путем инфицирования (заражения) наиболее чувствительных лабораторных животных.

Серологический – основан на обнаружении иммунных тел (антител) в сыворотках крови больных животных с помощью стандартных известных бактериальных антигенов, а также на идентификации, т.е. определения вида выделенной чистой культуры (антигена) с помощью стандартных специфических иммунных сывороток (содержащих антитела).

Контрольные вопросы

1. Каковы основные правила работы в микробиологической лаборатории?
2. Какие помещения включает микробиологическая лаборатория?
3. Назовите основные элементы механической части микроскопа.
4. Назовите основные элементы оптической части микроскопа.
5. Чем отличаются сухие объективы от иммерсионных?
6. Каково назначение макро- и микрометрического винтов?
7. Для чего нужна револьверная насадка?
8. Как определить увеличительную способность микроскопа?
9. Как регулировать степень освещенности препарата?
10. Перечислите методы исследований применяемы в микробиологической практике?

ТЕМА 2

СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ. МОРФОЛОГИЯ ПАЛОЧКОВИДНЫХ, КОККОВ И ИЗВИТЫХ

Микроорганизмы - это организмы, невидимые невооруженным глазом из-за их незначительных размеров. Этот критерий - единственный, который их объединяет. В остальном мир микроорганизмов еще более разнообразен, чем мир макроорганизмов.

Согласно современной систематике, микроорганизмы относятся к трем царствам:

Vira - к ним относятся вирусы;

Eucariotae - к ним относятся простейшие и грибы;

Procariotae - к ним относятся истинные бактерии, риккетсии, хламидии, микоплазмы, спирохеты, актиномицеты.

Основные отличия прокариот от эукариот состоят в том, что прокариоты не имеют:

морфологически оформленного ядра (нет ядерной мембраны и отсутствует ядрышко), его эквивалентом является нуклеоид, или генофор, представляющий собой замкнутую кольцевую двунитевую молекулу ДНК, прикрепленную в одной точке к цитоплазматической мембране; по аналогии с эукариотами эту молекулу называют хромосомной бактерией;

сетчатого аппарата Гольджи;

эндоплазматической сети;

митохондрий.

Имеется также ряд признаков или органелл, характерных для многих, но не для всех прокариот, которые позволяют отличать их от эукариотов:

многочисленные инвагинации цитоплазматической мембраны, которые называются мезосомы, они связаны с нуклеоидом и участвуют в делении клетки, спорообразовании, и дыхании бактериальной клетки;

специфический компонент клеточной стенки - муреин, по химической структуре - это пептидогликан (диаминопиеминовая кислота);

плазмиды - автономно реплицирующиеся кольцевидные молекулы двунитевой ДНК с меньшей, чем хромосома бактерий молекулярной массой. Они находятся наряду с нуклеоидом в цитоплазме, хотя могут быть и интегрированы в него, и несут наследственную информацию, не являющуюся жизненно необходимой для микробной клетки, но обеспечивающую ей те или иные селективные преимущества в окружающей среде. Наиболее известны плазмиды:

(F-плазмиды), обеспечивающие конъюгационный перенос между бактериями;

(R-плазмиды) - плазмиды лекарственной устойчивости, обеспечивающие циркуляцию среди бактерий генов, детерминирующих устойчивость к используемым для лечения различных заболеваний химиотерапевтическим средствам.

Также как для растений и животных, для названия микроорганизмов применяется бинарная номенклатура, - то есть родовое и видовое название, но если видовую принадлежность исследователям определить не удастся и определена только принадлежность к роду, то употребляется термин "species". Чаще всего это имеет место при идентификации микроорганизмов имеющих нетрадиционные пищевые потребности или условия существования.

Название рода обычно или основано на морфологическом признаке соответствующего микроорганизма (например, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Mycobacterium*) либо являются производными от фамилии автора, который открыл или изучил данный возбудитель (например, *Neisseria*, *Shigella*, *Escherichia*, *Rickettsia*, *Gardnerella*).

Видовое название часто связано с наименованием основного вызываемого этим микроорганизмом заболевания (например, *Vibrio cholerae* - холеры, *Shigella dysenteriae* - дизентерии, *Mycobacterium tuberculosis* - туберкулеза) или с основным местом обитания (например, *Escherichia coli* - кишечная палочка).

Кроме того, в русскоязычной медицинской литературе возможно использование соответствующего русифицированного названия бактерий (например, вместо *Staphylococcus epidermidis* - эпидермальный ста-

филококк; *Staphylococcus aureus* - золотистый стафилококк и т. д.).

Царство прокариот включает в себя отдел цианобактерий и отдел эубактерий, который, в свою очередь, подразделяется на порядки: собственно бактерии (отделы *Gracilicutes*, *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Mendosicutes*);

актиномицетов;

спирохет;

риккетсий;

хламидий.

Бактерии - это прокариотические, преимущественно одноклеточные микроорганизмы, которые могут также образовывать ассоциации (группы) сходных клеток, характеризующиеся клеточными, но не организменными сходствами.

Порядки подразделяются на группы. Основными таксономическими критериями, позволяющими отнести штаммы бактерий к той или иной группе, являются:

морфология микробных клеток (кокки, палочки, извитые);

отношение к окраске по Граму - тинкториальные свойства (грамположительные и грамотрицательные);

тип биологического окисления - аэробы, факультативные анаэробы, облигатные анаэробы;

способность к спорообразованию.

Дальнейшая дифференциация групп на семейства, рода и виды, которые являются основной таксономической категорией, проводится на основании изучения биохимических свойств. Этот принцип положен в основу классификации бактерий, приведенной в специальных руководствах - определителях бактерий.

Вид является эволюционно сложившейся совокупностью особей, имеющих единый генотип, который в стандартных условиях проявляется сходными морфологическими, физиологическими, биохимическими признаками. Для патогенных бактерий определение "вид" дополняется способностью вызывать определенные нозологические формы заболеваний.

Существует внутривидовая дифференцировка бактерий на варианты:

по биологическим свойствам (биовары или биотипы);

по биохимической активности (ферментовары);

по антигенному строению (серовары или серотипы);

по чувствительности к бактериофагам (фаговары или фаготипы);

по устойчивости к антибиотикам (резистентовары).

В микробиологии широко применяют специальные термины - культура, штамм, клон.

Культура - это видимая глазом совокупность бактерий на питательных средах. Культуры могут быть чистыми (совокупность бактерий одного вида) и смешанными (совокупность бактерий двух или более видов).

Штамм - это совокупность бактерий одного вида, выделенных из разных источников или из одного источника в разное время. Штаммы могут различаться по некоторым признакам, не выходящим за пределы характеристики вида.

Клон - это совокупность бактерий, являющихся потомством одной клетки.

Палочковидные бактерии

Основными морфологическими признаками палочковидных бактерий, которые определяются путем микроскопии, являются размеры палочек (средняя длина палочек – 2...7 мкм, диаметр в поперечнике - 0,5...1 мкм), взаимное расположение клеток, способность образовывать споры, подвижность.

Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, парно (*диплобактерии*) и цепочками (*стрептобактерии*, рис.2)

При микроскопии легко можно определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий. Вегетативные клетки хорошо адсорбируют красители на своей поверхности и полностью окрашиваются. Оболочка споры малопроницаема, краски в них почти не проникают и под микроскопом споры имеют вид округлых или овальных блестящих зерен.

Палочки, образующие споры называются *бациллами* и *кlostридиями* (рис.2). У бацилл размер споры не превышает ширину клетки и поэтому при образовании споры форма клетки не меняется. У кlostридий диаметр споры больше толщины клетки и поэтому при созревании споры клетка приобретает форму веретена (если спора располагается в центре клетки) или барабанной палочки (если спора располагается на одном из полюсов клетки).

Палочковидные бактерии бывают подвижные и неподвижные; клетки подвижных форм палочковидных бактерий снабжены специальными приспособлениями для движения – *жгутиками*.

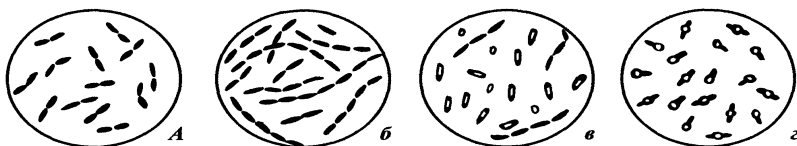


Рис. 2. Морфология палочковидных бактерий: а - диплобактерии; б - стрептобактерии; в - бациллы; г - кlostридии

Шаровидные бактерии (кокки)

Кокками называют сферические или шаровидные бактерии. Различные виды бактерий этой группы различаются между собой:

- диаметром (диаметр шаровидных бактерий не превышает 1-2 мкм);
- взаимным расположением клеток.

У разных видов бактерий закономерность расположения клеток после деления неодинакова. В зависимости от этого кокковые формы (рис.3) делятся на:

монококки или микрококки - клетки кокков располагаются по одиночке;

диплококки - кокки располагаются попарно, так как деление клетки происходит в одной плоскости;

стрептококки - кокки располагаются в виде цепочек, напоминающих нити бус, деление клеток происходит в одной плоскости, причем клетки после деления не отделяются друг от друга;

стафилококки - скопления кокков неправильной формы, напоминающих гроздь винограда. Деление этих кокков осуществляется в нескольких плоскостях;

тетракокки - образуют скопления из четырех клеток, что обусловлено делением клеток в двух взаимно перпендикулярных плоскостях;

сарцины - имеют вид скоплений кубической формы в результате деления в трех взаимно перпендикулярных плоскостях.

Все кокки неподвижны и не образуют спор.

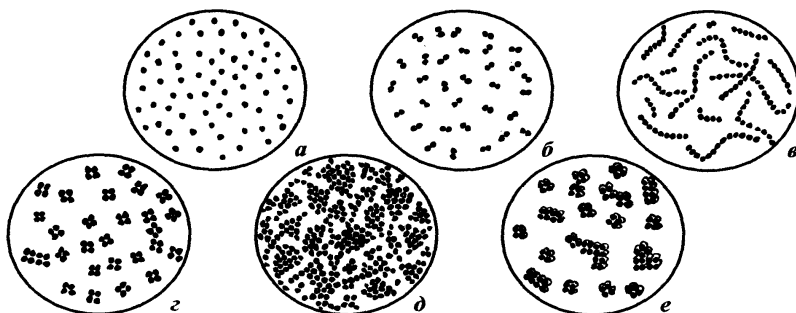


Рис. 3. Взаимные расположения кокков: а - микрококки; б - диплококки; в - стрептококки; г - тетракокки; д - стафилококки; е - сарцины

Извитые бактерии

Извитые формы бактерий в зависимости от степени изогнутости подразделяются на вибрионы, спириллы и спирохеты (рис. 4).

Вибрионы - имеют вид запятой, самые мелкие из извитых форм. Длина клетки вибрионов не превышает 1-3 мкм.

Клетки *спирилл* длиной от 5 до 30 мкм имеют один или несколько завитков.

Характерная особенность *спирохет* - крайне малый диаметр клетки (0,1-0,6 мкм) при относительно большой (5-500 мкм) длине клетки. Клетки спирохет имеют вид штопора, покрыты эластичной оболочкой, позволяющей им винтообразно изгибать тело.

Все извитые формы подвижны. Движение осуществляется с помощью жгутиков (у вибрионов и спирилл) или за счет сокращения всей клетки (у спирохет).

Кроме этих наиболее распространенных в природе форм бактерий в почве и водоемах обнаружены новые формы бактерий: торроиды, простеки, нитчатые бактерии (рис. 5).

Торроиды имеют вид разомкнутого или замкнутого кольца.

Простеки имеют форму шестиугольной звезды, розетки, клетки с выростами.

Нитчатые бактерии - типичные водные организмы. Нити их имеют толщину в среднем 1-7 мкм.

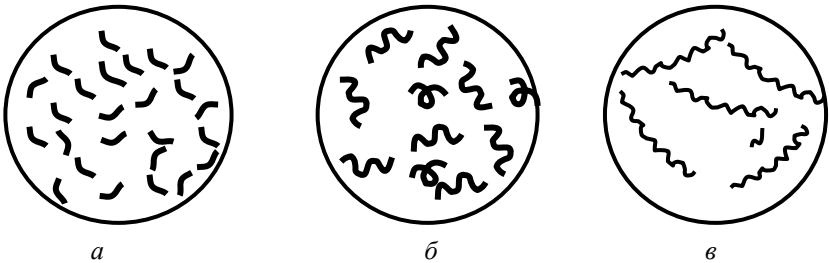


Рис. 4 Морфология извитых бактерий: а - вибрионы; б - спириллы; в - спирохеты



Рис. 5. Новые формы бактерий: а – торроиды; б – простеки; в – нитчатые бактерии

Контрольные вопросы

1. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как палочковидные?
2. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как шаровидные?
3. Перечислить основные внешние признаки, по которым микробов определяют как извитые?
4. Как осуществляется движение у бактерий?
5. Что такое «бациллы» и «кlostридии» и в чем их различия?
6. Какие новые формы бактерий Вам известны?
7. Какие взаимные расположения палочковидных бактерий Вам известны?
8. Какие извитые формы бактерий Вы знаете?

ТЕМА 3 МОРФОЛОГИЯ РИККЕТСИЙ, ХЛАМИДИЙ, МИКОПЛАЗМ, ГРИБОВ

Риккетсии

Риккетсии (Rickettsia) относятся к бактериоподобным микроорганизмам, так как они имеют ряд признаков, свойственных бактериям. Вместе с тем риккетсии обладают и некоторыми свойствами вирусов. Поэтому другие ученые отводят им промежуточное положение между бактериями и вирусами. Третьи — убеждены в том, что риккетсии составляют самостоятельную группу микроорганизмов и классифицируют их на роды, виды и типы.

Форма риккетсий кокковидная, палочковидная, нитевидная. (рис.6). При окраске по Романовскому—Гимза в них обнаруживают зерна. На основе изложенного П.Ф. Здродовский различает формы

риккетсий: а) кокковидные однозернистые (до 0,5 мкм); б) палочковидные двузернистые (1 —1,5 мкм); с) бациллярные трех-четырёхзернистые (3—4 мкм) и д) нитевидные многозернистые (от 10 до 40 мкм). Все формы взаимобратимы: а→б→с→д→а и т.д. В фазе активного и быстрого размножения многие риккетсии подвижны. Окрашиваются по Романовскому—Гимза в синий, по Цилю—Нильсену — в розовый, импрегнируются серебром по Морозову в коричнево-черный цвета. Структурно имеют наружную и внутреннюю стенки, цитоплазму, гранулы, вакуоли, нуклеоид.

Размножаются загадочно. Последние данные ученых свидетельствуют о том, что риккетсии репродуцируются подобно крупным вирусам. Попав в животную клетку, они продельывают в ней семь стадий цикла развития, затем выходят наружу, внедряются в новые клетки и повторяют все сначала. На пятой стадии делятся, как бактерии, на мелкие кокковидные частицы.

Являются внутриклеточными паразитами. Культивируются в тканевых культурах, куриных эмбрионах; их поддерживают в легких зараженных мышей, в организме вшей, клещей, блох. Риккетсии волынской лихорадки и пароксизмального клещевого риккетсиоза выращивают и на бесклеточных искусственных средах; в организме могут расти и в межклеточных пространствах, тогда как остальные представители этого класса — только в ядрах или цитоплазме животных клеток.

Риккетсии вырабатывают ферменты и витамины, необходимые для самостоятельного биосинтеза белков и липидов, для извлечения энергии из углеводов. Находясь же в живой клетке, они используют часть готовых веществ на свои нужды.

Более сорока видов риккетсий непатогенны для человека и животных, обитают в членистоногих насекомых; свыше тридцати разновидностей обуславливают болезни млекопитающих.



Рис. 6. Морфология и строение риккетсий (по Здродовскому); а - кокковидные формы; б — палочковидные формы; в — бациллярные формы; г — нитевидные формы; д — дробление нитевидных форм

Хламидии

Хламидии, или гальпровии, относятся к облигатным внутриклеточным кокковидным грамотрицательным бактериям (рис.7). Геном хламидий содержит в 4 раза меньше генетической информации, чем геном кишечной палочки. Хламидии размножаются только в живых клетках: их рассматривают как энергетических паразитов. По-видимому, у хламидий отсутствует система регенерации АТФ. Вне клеток хламидии имеют сферическую форму (0,3 мкм), являясь элементарными тельцами. Внутри клеток они превращаются в делящиеся ретикулярные тельца, образуются их скопления-включения. У человека хламидий вызывают трахому, орнитоз и др.

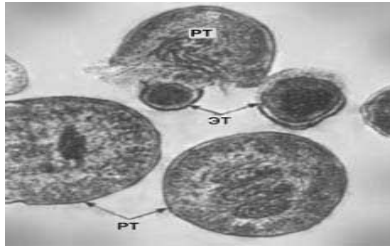


Рис. 7. Хламидии (ЭТ - элементарные тельца; РТ - ретикулярные тельца)

Микоплазмы

Микоплазмы (Mycoplasma) — мельчайшие микроорганизмы размером 100—150 нм, редко 200—700 нм, лишенные стенок и оформленного ядра, спор не образуют (рис.8).

Из-за отсутствия наружной оболочки микоплазмы полиморфны, имеют зернистую, шаровидную, гроздевидную, нитевидную и кольцеобразную формы, проходят через многие бактериальные фильтры (рис. 8). Химический состав их близок к составу бактерий. Культивируются преимущественно в аэробных условиях, на средах, содержащих сыворотку животных. Первичные культуры нуждаются; также в добавлении к средам ДНК и РНК- Некоторые разлагают углеводы, другие нет. Дифференцируются по антигенной структуре.

Насчитывают 35 видов микоплазм. Широко распространены в природе. Имеются сапрофитные и патогенные для человека, животных и птиц виды. Вызываемая микоплазмами инфекция называется микоплазма-инфекция. Наиболее типичные представители — возбудители перипневмонии крупного рогатого скота и инфекционной агалактии коз и овец.

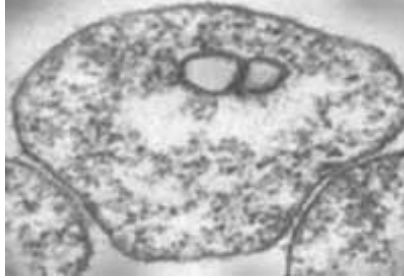


Рис. 8. Микоплазмы

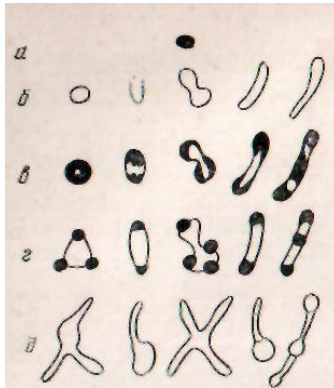


Рис. 9. Развитие микоплазм на жидкой питательной среде
(по Klicnberger — Nobel, 1962):
а — основной структурный элемент;
б, в, г, д — стадии образования разнообразных клеток

Морфология грибов

Плесневые грибы. Грибы — бесхлорофилльные микроорганизмы, обитающие на поверхности различных субстратов. Клетки грибов имеют дифференцированное ядро, поэтому их относят к эукариотам. Плесневые грибы не требовательны к питательным средам, но большинство из них нуждаются в кислороде воздуха. Они легко выдерживают низкие температуры, могут жить и размножаться в холодильных камерах. Среди грибов встречаются как сапрофиты, так и паразиты.

Все грибы делят на высшие и низшие и относят к четырем классам. Фикомицеты (*Phycomycetes*) принадлежат к низшим грибам, аскомицеты (*Ascomycetes*), базидиомицеты (*Basidiomycetes*) и несовершенные (*Fungi imperfect Deuteromycetes*) — к высшим.

Грибы не имеют хлорофилла, поэтому они используют для своего питания углерод только из готовых органических соединений, т.е. они являются гетеротрофами. Все грибы, кроме примитивных низших и некоторых высших (дрожжей), имеют вегетативное тело — мицелий, или грибницу, состоящую из тонких ветвящихся гиф. Мицелий может быть погруженный (субстратный), развивающийся внутри среды и поверхностный (воздушный), развивающийся на поверхности среды.

У низших грибов он одноклеточный (см. рис. 10а), у высших — многоклеточный септированный, разделенный перегородками или перетяжками (рис. 10б, 10в).

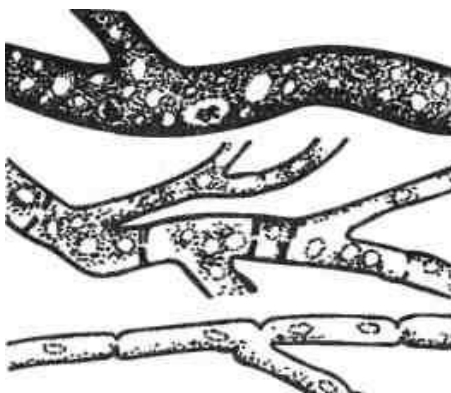


Рис. 10. Вегетативные формы грибов
а — одноклеточные; б — с перегородками; в — с перетяжками

Гифы размножаются разными способами: спорообразованием (хламидоспоры, артроспоры, бластоспоры, конидиоспоры, рис.11), половым и бесполом путем (почкованием, распадом гиф, образованием хламидоспор).

Мукор — представитель класса фикомицетов. Растет в виде пушистого серого налета. Рост на средах появляется в течении первых суток.

Аспергилл (леечная плесень) — представитель несовершенных грибов. Растет более медленно. Рост появляется на вторые сутки. Конидии могут быть черного (*A. niger*) и зеленовато-желтого цвета (*A. oryzae*).

Пеницилл (кистевик) — представитель несовершенных грибов. Образует на среде нежный налет в виде пушка серо-зеленого цвета или ярко-зеленого с белым ободком до периферии. Хорошо выраженные кисточки появляются на вторые-третьи сутки.

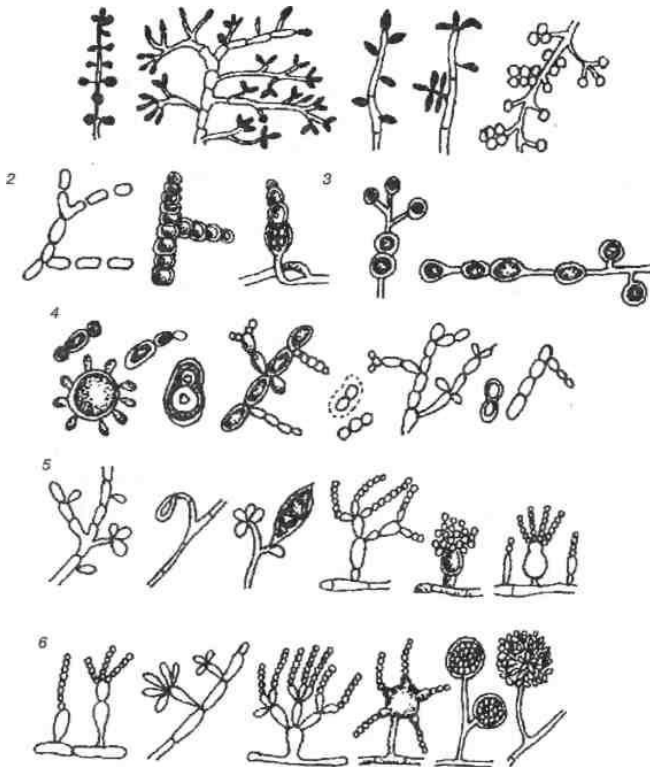


Рис. 11. Формы спорообразования у грибов:
 1 – алейрии; 2 – артроспоры; 3 – хламидоспоры; 4 – бластоспоры;
 5 – конидии разных типов; 6 – спорангиоспоры

Несовершенные грибы (фузариум). Мицелий белый, розовый или желтый. От него отходят короткие ветвящиеся конидиеносцы, на концах которых располагаются конидии. Они могут быть серповидные с несколькими перегородками (макроконидии) и овальные (микроконидии), чаще без перегородок. Хламидоспоры бывают шаровидными, грушевидными; располагаются в виде скоплений или цепочкой. Образуются в старых конидиеносцах, строме и конидиях. Воздушный мицелий хорошо развит.

Иногда мицелий грибов образует ризоиды — корешкообразные выросты, при помощи которых крепится к субстрату и получает питательные вещества.

Склероции — сплетения гиф округлой или продолговатой формы. Они имеют большие размеры, уплотнены, устойчивы к неблаго-

приятным воздействиям среды, содержат мало воды и много питательных веществ. У некоторых высших грибов склероции представляют покоящуюся стадию мицелия. Многие грибы образуют хламидоспоры — разросты мицелия с утолщенной оболочкой, внутри которых содержатся питательные вещества. Они могут быть одно- и многоклеточными и служат для сохранения вида, так как хорошо переносят неблагоприятные условия среды.

Конидиеносцы у монилиевых. Спорангиеносцы заканчиваются расширением — спорангием с эндоспорами. При разрыве спорангия эндоспоры освобождаются и, попадая в благоприятные условия, дают начало новой плесени. На конидиеносцах образуются конидии, или экзоспоры, разной формы: шаровидной, булабовидной, продолговатой и др. Конидии могут быть одиночные, когда образуются по одной на каждом ответвлении конидиеносца, и множественные, если образуется несколько. Конидиеносцы бывают простые (неразветвленные) и разветвленные. Разветвленные имеют на конце ветвления верхушечные клетки шиловидной или веретеновидной формы, называемые стеригмами. У аспергилла стеригмы располагаются на расширении конидиеносца, они бывают одно- и двухъярусные. Нижняя клетка стеригм несет несколько клеток второго яруса. Возбудитель эрготизма (*S. purpurea*) проходит сложный цикл развития и в конечном итоге, попадая на зерновку злаков, формирует токсичные для животных и человека рожки.

От мицелия отходят плодоносящие тела: спорангиеносцы у мушкетеровых и фузариумы широко распространены в природе. Многие из них вызывают порчу плодов, овощей. Фузариумы, особенно при низких температурах, образуют токсины. При поедании животными и птицей пораженных растений и зерна наступает отравление. Клинически это проявляется нарушением координации движений, поражением слизистой ротовой полости, расстройством пищеварения.

Лучистые грибы (актиномицеты) - это одноклеточные растительные организмы, совмещающие в себе признаки бактерий и низших грибов (рис.13). Гифы мицелия актиномицетов лучезарно разрастаются по субстрату (откуда и название лучистые), что сближает их с грибами. Толщина гиф не превышает толщину бактерий, поэтому их также рассматривают под иммерсионной системой микроскопа.

Мицелий субстратный и воздушный. Вначале образуется субстратный, а затем воздушный мицелий, придающий колонии бархатистый вид. Колонии актиномицетов плотной консистенции, прочно сросшиеся с питательной средой, поэтому извлекаются вместе с субстратом. Актиномицеты образуют пигмент и бывают окрашены в разные цвета: розовый, красный, бурый, черный и др. Вид актиномицетов определяют по строе-

нию воздушного мицелия. От мицелия отходят спорангиеносцы со спорами на концах (органы плодоношения). Актиномицеты — аэробы, растут на крахмально-аммиачном агаре при 30-35°С.

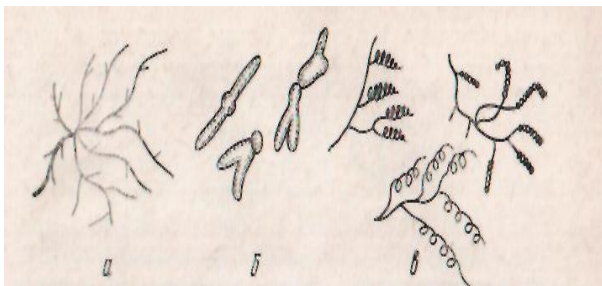


Рис. 12. Морфология и строение актиномицетов:
а — общий вид мицелия; б — прорастание спор; в — строение спорансиоцев

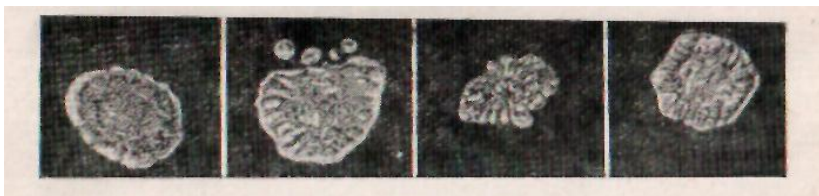


Рис. 13. Колонии актиномицетов (по Красильникову)

Дрожжи - это безмицелиальные одноклеточные почкующиеся грибы, принадлежащие к классу аскомицетов. Форма клеток разная, но чаще овальная, круглая или лимоноподобная (рис. 14).

Клетки дрожжей имеют оболочку, цитоплазму и, в отличие от прокариотов, оформленное ядро, которое хорошо видно в неокрашенном препарате. Цитоплазма молодых клеток более однородна: с течением времени появляются вакуоли. Дрожжи крупнее бактериальных клеток, их диаметр колеблется от 10 до 15 мкм. Внутри клеток дрожжей образуются споры (от 4 до 12), после чего они становятся сумками (асками). Различают еще артроспоры, или покоящиеся клетки дрожжей. Они отличаются от вегетативных форм наличием двухконтурной оболочки, большим количеством запасных питательных веществ (гликогена, жира) и отсутствием вакуолей. Размножение дрожжей происходит почкованием, спорами и половым путем (копуляцией).

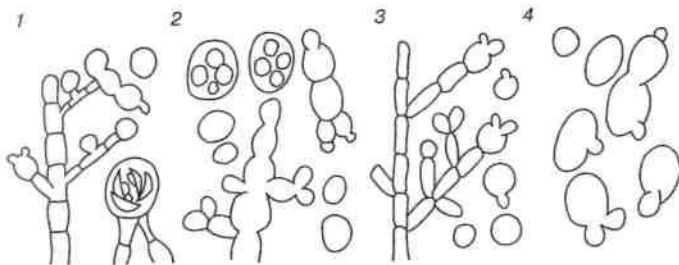


Рис. 14. Форма дрожжей, типы образования асков, мицелия и почкования:
 1 — *Endomycopsis* (аски, мицелий, почкование); 2 — *Saccharomyces* (аски, почкование);
 3 — *Candida* (мицелий, почкование); 4 — *Torulopsis* (почкование)

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные внешние признаки риккетсий.
2. Перечислите основные внешние признаки микоплазм и хламидий.
3. Дайте характеристику плесневых грибов.
4. Дайте характеристику несовершенных грибов.
5. Дайте характеристику лучистых грибов, дрожжей.

ТЕМА 4 СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Клетка прокариотических организмов имеет сложное строго упорядоченное строение и обладает принципиальными особенностями субмикроскопической организации и химического состава.

Структурные компоненты бактериальной клетки делят на основные и временные (рис.15). Основные структуры — это клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами и различными включениями, нуклеоид.

Временные — капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки, эндоспоры, образующиеся лишь на определенных этапах жизненного цикла бактерии; у некоторых видов они отсутствуют полностью.

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

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

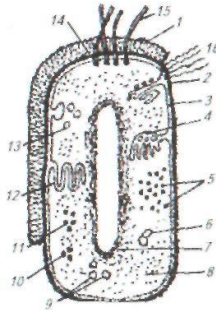


Рис. 15. Схема строения прокариотической клетки:

- 1— капсула; 2 — клеточная стенка; 3—цитоплазматическая мембрана; 4 — мезосома;
 5 — рибосомы; 6 — гранулы полифосфата; 7— нуклеоид; 8— цитоплазма; 9— капли серы;
 10 — капли жира; 11— плазида; 12 — тилакоиды; 13- хроматофоры;
 14— базальное тельце; 15— жгутики; 16— пили

Клеточная стенка. Важный структурный элемент бактериальной клетки, находится между цитоплазматической мембраной и капсулой; у бескапсульных бактерий — это внешняя оболочка клетки. Она имеется у всех прокариот, за исключением микоплазм и L-форм бактерий. Выполняет ряд функций: защищает бактерии от осмотического шока и других повреждающих факторов, определяет их форму, участвует в метаболизме, а у многих видов патогенных бактерий токсична за счет поверхностных антигенов или несет на поверхности специфические рецепторы для фагов. Клеточная стенка пронизана порами, через которые происходит транспорт экзотоксинов и других экзотоксинов бактерий. Толщина клеточной стенки 10... 100 нм; она содержит от 5 до 50 % сухого вещества клетки.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является *пептидогликан*, или *муреин* (от лат. *murus* — стенка), — опорный полимер сетчатой структуры, образующий ригидный (жесткий) наружный каркас бактериальной клетки.

Клеточная стенка грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране, массивна, ее толщина составляет 20...100нм. Для нее характерно наличие тейхоевых кислот, которые связаны с пептидогликаном и представляют собой полимеры трехатомного спирта — глицерина или пятиатомного спирта — рибита, остатки которых соединены фосфодиэфирными связями. Тейхоевые кислоты связывают ионы магния и участвуют в транспортировке их в клетку. В составе клеточной стенки также присутствуют в небольших количествах полисахариды, белки и липиды.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, ее толщина составляет 14... 17 нм. Внутренний слой — пептидогликан, образует тонкую (2 нм) непрерывную сетку. Пептидогликан содержит только мезодиаминопимелиновую кислоту и не имеет лизина. Внешний слой клеточной стенки — наружная мембрана — состоит из фосфолипидов, липопротеина и белков.

Структурные компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий ограничены от цитоплазматической мембраны и разделены промежутком, называемым периплазмой или периплазматическим пространством.

Протопласты и сферопласты. Протопласты — это формы прокариот, полностью лишенные клеточной стенки, образуемые обычно грамположительными бактериями. Сферопласты — бактерии с частично разрушенной клеточной стенкой с сохранением элементов наружной мембраны. Наблюдаются у грамотрицательных бактерий и значительно реже — у грамположительных. Образуются в результате разрушения пептидогликанового слоя литическими ферментами, например лизоцимом, или блокирования биосинтеза пептидогликана пенициллином в среде с соответствующим осмотическим давлением.

Протопласты и сферопласты имеют сферическую или полисферическую форму и в 3—10 раз крупнее исходных клеток. В обычных условиях в результате осмотического лизиса они погибают, а при повышенном осмотическом давлении способны некоторое время переживать, расти и даже делиться. Протопласты при снятии фактора, разрушающего пептидогликан, как правило, отмирают, но могут превращаться в L-формы; сферопласты легко реверсируют в исходные бактерии, иногда трансформируются в L-формы или же гибнут.

L-формы бактерий — это фенотипические модификация, или мутанты, бактерии, частично или полностью утратившие способность синтезировать пептидогликан клеточной стенки. Таким образом, L-формы — бактерии с дефектной клеточной стенкой. Образуются при воздействии L-трансформирующих агентов — антибиотиков (пенициллина, полимиксина, бацитрацина, стрептомицина), аминокислот (глицина, метионина, лейцина и др.), фермента лизоцима, ультрафиолетового и рентгеновского излучения. В отличие от протопластов и сферопластов L-формы обладают относительно высокой жизнеспособностью и выраженной способностью к репродукции. Клетки L-форм имеют хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран и миелиноподобные структуры. Вследствие дефекта клеточной стенки они осмотически неустойчивы и их можно куль-

тивировать только на специальных средах с высоким осмотическим давлением; они проходят через бактериальные фильтры.

Различают стабильные и нестабильные L-формы бактерий. Стабильные полностью лишены ригидной клеточной стенки, что сближает их с протопластами, и крайне редко реверсируют в исходные бактериальные формы. Нестабильные могут обладать элементами клеточной стенки, в чем они проявляют сходство со сферопластами, в отсутствие фактора, вызвавшего их образование, реверсируют в исходные клетки.

Процесс образования L-форм получил название L-трансформации, или L-индукции. Способностью к L-трансформации обладают практически все виды бактерий, в том числе и патогенные (возбудители бруцеллеза, туберкулеза, листерии и др.).

Цитоплазматическая мембрана и ее производные. Цитоплазматическая мембрана (плазмолемма) — полупроницаемая липопротеидная структура бактериальных клеток, отделяющая цитоплазму от клеточной стенки. Она является обязательным полифункциональным компонентом клетки и составляет 8...15 % ее сухой массы. Разрушение цитоплазматической мембраны приводит к гибели бактериальной клетки. На ультратонких срезах в электронном микроскопе выявлено ее трехслойное строение — два ограничивающих осмиофильных слоя толщиной 2...3 нм каждый и один осмиофобный центральный слой толщиной 4...5 нм.

Цитоплазматическая мембрана представляет собой белково-липидный комплекс, состоящий из 50...75 % белков и 15...20% липидов. Цитоплазматическая мембрана играет роль осмотического барьера клетки, контролирует поступление питательных веществ и выход продуктов метаболизма наружу; ее субстратспецифические ферменты — пермеазы, осуществляют активный избирательный перенос органических и неорганических молекул.

Ферменты цитоплазматической мембраны катализируют конечные этапы синтеза мембранных липидов, компонентов клеточной стенки, капсулы и экзоферментов; на мембране локализованы ферменты окислительного фосфорилирования и ферменты транспорта электронов, ответственные за синтез энергии.

В процессе роста клетки цитоплазматическая мембрана образует многочисленные инвагинаты, формирующие внутрицитоплазматические мембраны структуры. Локальные инвагинаты мембраны получили название *мезосом*. Они хорошо выражены у грамположительных бактерий, хуже — у грамотрицательных и плохо — у риккетсий и микоплазм.

Установлена связь мезосом с хромосомой бактерии; такие

структуры называются *нуклеидосомами*. Мезосомы, как и цитоплазматическая мембрана, представляют собой центры дыхательной активности бактерий, поэтому их иногда называют аналогами митохондрий. Мезосомы увеличивают рабочую поверхность мембран, возможно, выполняют только структурную функцию, производя разделение бактериальной клетки на относительно обособленные отсеки, что создает более благоприятные условия для протекания ферментативных процессов. У патогенных бактерий они обеспечивают транспортировку белковых молекул экзотоксинов.

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

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

В цитоплазме бактерий присутствуют (непостоянно) различного типа *включения*: твердые, жидкие и газообразные, с белковой мембраной или без нее. Значительная их часть представляет собой запасные питательные вещества и продукты клеточного метаболизма. К запасным питательным веществам относятся: полисахариды, липиды, полифосфаты, отложения серы и др. Из включений полисахаридной природы чаще обнаруживают гликоген и крахмалоподобное вещество гранулезу, которые служат источником углерода и энергетическим материалом. К включениям, окруженным мембраной, также относятся газовые *вакуоли*, или *аэросомы*, которые встречаются у водных прокариот. Они снижают удельную массу клеток.

Нуклеоид. Ядро у прокариот состоит из одной замкнутой в кольцо двухспиральной нити ДНК длиной 1,1...1,6нм, которую рассматривают как одиночную бактериальную хромосому, или *генофор*. Нуклеоид не отделен от остальной части клетки мембраной, т.е. у него отсутствует ядерная оболочка.

В состав структур нуклеоида входят РНК-полимераза, основные белки, (гистоны отсутствуют). Хромосома закрепляется на цитоплазматической мембране, а у грамположительных бактерий — на мезосоме. Нуклеоид не имеет митотического аппарата, и расхождение дочерних ядер обеспечивает рост цитоплазматической мембраны.

Бактериальное ядро — дифференцированная структура. В зависимости от стадии развития клетки нуклеоид может быть дискрет-

ным (прерывистым) и состоять из отдельных фрагментов. В нуклеоиде сосредоточен основной объем генетической информации бактериальной клетки.

Кроме нуклеоида в клетках многих бактерий обнаружены внехромосомные генетические элементы — *плазмиды*, представленные небольшими кольцевыми молекулами ДНК, способными к автономной репликации.

Капсула. Слизистый слой над клеточной стенкой бактерии. Вещество капсулы четко отграничено от окружающей среды. В зависимости от толщины слоя и прочности соединения с бактериальной клеткой различают видимую *макрокапсулу*, толщиной 0,2 мкм, в световом микроскопе, и *микрокапсулу*, толщиной менее 0,2 мкм, обнаруживаемую лишь при электронной микроскопии или выявляемую химическими и иммунологическими методами.

Вещество капсул состоит из высокогидрофильных мицелл, химический же состав их весьма разнообразен. Основные компоненты большинства капсул прокариот — гомо- или гетерополисахариды (энтеробактерии и др.).

Капсула — полифункциональный органоид, выполняющий важную биологическую роль. Служит местом локализации капсульных антигенов, определяющих вирулентность, антигенную специфичность и иммуногенность бактерий. Утрата капсулы у патогенных бактерий резко снижает их вирулентность. Капсулы обеспечивают выживание бактерий, защищая их от механических повреждений, высыхания, токсических веществ, заражения фагами, а у патогенных форм — от действия защитных сил макроорганизма: инкапсулированные клетки плохо фагоцитируются. У некоторых видов бактерий, в том числе и патогенных, капсула способствует прикреплению клеток к субстрату.

Жгутики. Органы движения бактерий в виде тонких, длинных, нитевидных структур белковой природы. Их длина превышает бактериальную клетку в несколько раз и составляет 10...20 мкм, а у некоторых спирилл достигает 80...90 мкм. Нить жгутика (фибрилла) — полный спиральный цилиндр диаметром 12...20 нм. Жгутик состоит из трех частей: спиральной нити, крюка и базального тельца. *Крюк* — изогнутый белковый цилиндр, выполняющий функцию гибкого связывающего звена между базальным и жесткой нитью жгутика. *Базальное тельце* — сложная структура, состоящая из центрального стержня (оси) и колец.

Жгутики не жизненно важные структуры бактериальной клетки: существуют фазовые вариации бактерий, когда в одной фазе развития клетки они имеются, в другой — отсутствуют.

Количество жгутиков (от 1 до 50 и более) 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 бокам клетки или на всей ее поверхности (рис. 16). Бактерии, не имеющие жгутиков, называют *атрихиями*.

Будучи органами движения, жгутики типичны для плавающих палочковидных и извитых форм бактерий и лишь в единичных случаях встречаются у кокков. Они обеспечивают эффективное перемещение в жидкой среде и более медленное по поверхности твердых субстратов.

Бактерии передвигаются беспорядочно, однако они способны к направленным формам движения — *таксисам*, в зависимости от внешних стимулов. Реагируя на различные факторы окружающей среды, бактерии за короткое время локализуются в оптимальной зоне обитания. Таксис может быть положительным и отрицательным. *Хемотаксис* происходит в результате разницы в концентрации химических веществ в среде, *аэротаксис* — кислорода, *фототаксис* — интенсивности освещения, *магнитотаксис* обусловлен способностью микроорганизмов ориентироваться в магнитном поле.



Рис. 16. Жгутики
а- монотрихи, б- амфитрихи, в-лофотрихи, г-перитрихи

Пили (фимбрии, ворсинки) — прямые, тонкие, полые белковые цилиндры толщиной 3...25нм и длиной до 12 мкм, отходящие от поверхности бактериальной клетки. Образованы специфическим белком — пилином; берут начало от цитоплазматической мембраны, встречаются у подвижных и неподвижных форм бактерий и видимы только в электронном микроскопе. На поверхности клетки может быть от 1...2, 50...400 пилей до нескольких тысяч.

Существует два класса пилей: половые (секс-пили) и пили об-

щето типа, которые чаще называют *фимбриями*. У одной и той же бактерии могут быть пили разной природы. *Половые* пили на поверхности бактерий в процессе конъюгации выполняют функцию органелл, через которые происходит передача генетического материала (ДНК) от донора к реципиенту.

Пили *общего типа* располагаются перитрихально (кишечная палочка) или на полюсах (псевдомонады); на одной бактерии их может быть сотни. Они принимают участие в слипании бактерий в агломераты, прикреплении микробов к различным субстратам, в том числе к клеткам (адгезивная функция), в транспорте метаболитов, а также способствуют образованию пленок на поверхности жидких сред; вызывают агглютинацию эритроцитов.

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*. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора.

Основная функция спор — сохранение бактерий в неблагоприятных условиях окружающей среды. Переход бактерий к спорообразованию наблюдается при истощении питательного субстрата, недостатке углерода, азота, фосфора, накоплении в среде катионов калия и марганца, изменении pH, повышении содержания кислорода и др.

В световом микроскопе споры видны в виде овальных, иногда округлых, сильно преломляющих свет образований размером 0,8...1,0—1,2...1,5 мкм; они могут располагаться *центрально* (*B. anthracis*), *субтерминально* — ближе к концу (*C. botulinum*), *терминально*—на конце палочек (*C. tetani*). Строение зрелой споры сложное и однотипное у разных видов бактерий. Центральная ее часть представлена *сердцевинной*, или *спороплазмой*, содержащей нуклеоид, рибосомы и нечетко выраженные мембраны структуры. Спороплазма окружена *цитоплазматической мембраной*, к которой прилегает зачаточный *пептидогликановый слой*, затем специфическим для спор массивным слоем *кортекса*, или *кору*. Кортекс состоит из мукопептидов, весьма сходных с мукопептидами клеточных стенок. В кортексе содержится также диаминопимелиновая кислота. Внутренняя плотная часть кортекса, прилегающая к мембране сердцевинной, при прорастании спор оформляется в клеточную стенку молодой вегетативной клетки. На поверхности кортекса имеется внешняя мембрана. Снаружи спора окружена *многослойной оболочкой*. У многих бактерий по окружности наружного слоя споровой оболочки располагается *экзоспорум*.

Контрольные вопросы

1. Образование протопластов, сферопластов, L-форм.
2. Цитоплазматическая мембрана и ее производные.
3. Мезосомы, типы, функции.
4. Транспортные и другие функции ЦПМ.
5. Органоиды прокариотной клетки.
6. Нуклеоид, плазмиды, эписомы.
7. Механизмы репликации бактериальной хромосомы.
8. Капсула, химизм, структура, функции.
9. Жгутики: строение, расположение, движение.
10. Типы движения у бактерий.
11. Фимбрии (пили): строение, типы, функции.
12. Эндоспоры, их биологический смысл, строение, типы, формирование, прорастание.

ТЕМА 5 МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ. МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Приготовление мазков

Исследуемый материал распределяют тонким слоем по поверхности предметного хорошо обезжиренного стекла.

Мазки готовят из культур микробов, патологического материала (мокрота, гной, моча, кровь и др.) и из органов трупов. Приготовление препарата для микроскопии складывается из следующих этапов:

1. Приготовление мазка на обезжиренном предметном стекле.
2. Высушивание препарата.
3. Фиксация мазка.
4. Окраска мазка.

В правильно приготовленном препарате микробные клетки должны быть расположены в один слой.

Техника приготовления мазков определяется характером исследуемого материала (рис.17).

1. Приготовление мазков из микробных культур с жидкой питательной среды и из жидкого патологического материала (моча и др.). Маленькую каплю исследуемой жидкости наносят бактериальной петлей на предметное стекло и круговыми движениями петли распределяют равномерным слоем в виде кружка диаметром в копеечную монету.

2. *Приготовление мазков из крови.* На предметное стекло, ближе к одному из его концов, наносят каплю крови. Второе - шлифованное - стекло, которое должно быть уже предметного, ставят на первое под углом 45° и подводят к капле крови до соприкосновения с ней. После того как кровь растечется по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по всей поверхности стекла. Толщина мазка зависит от величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет светло-розовую окраску и одинаковую толщину на всем протяжении.

3. *Приготовление толстой капли.* На середину предметного стекла пастеровской пипеткой наносят каплю крови или прикладывают стекло непосредственно к капле крови, выступающей из пальца. Нанесенную на стекло кровь размазывают бактериальной петлей так, чтобы диаметр образующегося мазка соответствовал величине копеечной монеты. Стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания крови. Кровь в "толстой капле" распределяется неравномерно, образуя неровный край.

4. *Приготовление мазка из вязкого материала (мокрота, гной).* Мокроту или гной, нанесенные на предметное стекло ближе к узкому краю, накрывают другим предметным стеклом. Стекла слегка прижимают друг другу. После этого свободные концы стекол захватывают 1 и 2 пальцами обеих рук и разводят в противоположные стороны так, чтобы при движении оба стекла плотно прилегали друг к другу. Получаются мазки с равномерно распределённым материалом, занимающим большую часть.

5. *Приготовление мазка из культур с плотных питательных сред.* На середину чистого, хорошо обезжиренного стекла наносят каплю физиологического раствора или дистиллированной воды, в нее вносят бактериальную петлю с небольшим количеством исследуемой микробной культуры так, чтобы капля жидкости стала слегка мутноватой. После этого излишек микробного материала на петле сжигают в пламени горелки и приступают к приготовлению мазка по описанному выше способу.

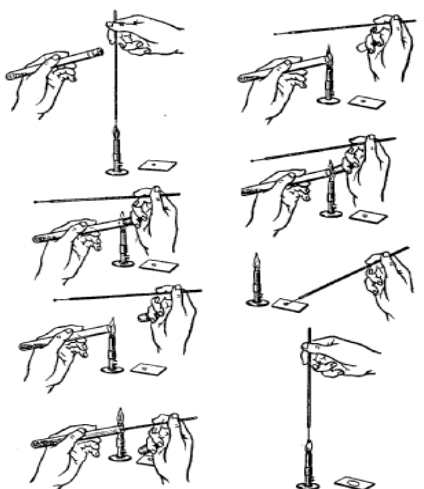


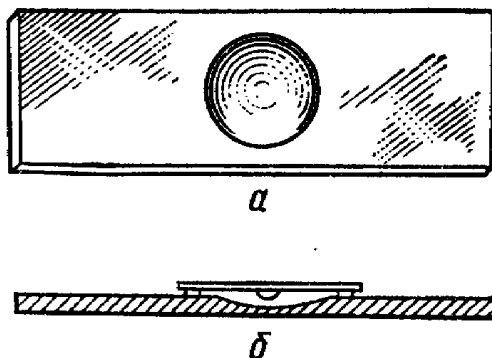
Рис. 17. Схема приготовления препарата-мазка

6. *Приготовление мазков из органов и тканей.* Поверхность органа с целью обеззараживания прижигают накалившими браншами пинцета, делают по этому месту надрез и из глубины остроконечными ножницами вырезают небольшой кусочек ткани, который помещают между двумя предметными стеклами. Далее поступают так же, как при приготовлении мазка из гноя и мокроты. Если ткань органа плотная, то из глубины разреза делают скальпелем соскоб. Полученный при соскабливании материал распределяют тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериальной петлей. Для изучения взаимного расположения элементов ткани и находящихся в ней микроорганизмов делают мазки-отпечатки. Для этого вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватывают пинцетом и прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу несколько раз последовательно, получая, таким образом, ряд мазков-отпечатков.

7. *Препарат «раздавленная капля».* На чистое предметное стекло наносят из флакона каплю воды. В нее из пробирки вносят петлей небольшое количество исследуемой культуры, и осторожно перемешивают, не размазывая по стеклу. Культуру, выращенную в жидкой среде, наносят на предметное стекло пипеткой.

Суспензию микроорганизмов накрывают сверху покровным стеклом так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха, мешающих исследованию. Избыток выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой, прикладывая ее к краям покровного стекла.

На покровное стекло наносят каплю кедрового масла и препарат рассматривают с помощью иммерсионного объектива при опущенном конденсоре. Активно движущиеся бактерии проплывают через все поле зрения, меняют направления, совершают вращательные и круговые движения.



*Рис. 18. Исследование микробов на подвижность
а - стекло с луночкой; б - «висячая капля»*

8. *Препарат «висячая капля».* Для приготовления такого препарата требуются специальное предметное стекло с лункой посередине и обычное покровное стекло (рис.18б). Край лунки предметного стекла смазывают вазелином. Небольшую каплю бульонной культуры микроорганизмов (суспензию) наносят на середину покровного стекла. Предметное стекло переворачивают лункой вниз и опускают ее на покровное стекло таким образом, чтобы находящаяся на нем капля суспензии приходилась на центр лунки.

Предметное стекло слегка прижимают к покровному, и стекла склеиваются. Препарат приподнимают и быстро переворачивают покровным стеклом кверху. Получается герметическая камера, в которой капля долго не высыхает. В правильно подготовленном препарате капля должна свободно свисать с покровного стекла и не соприкасаться с дном или краями лунки.

На покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают с объективом 90х в затемненном поле зрения (при суженной диафрагме и опущенном конденсоре).

Высушивание и фиксирование мазков. Приготовленный на предметном стекле мазок высушивают и после высыхания фиксируют. При фиксировании мазок закрепляется на поверхности предметного

стекла, и поэтому при последующей окраске препарата микробные клетки не смываются. Кроме того, убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые. Различают физический способ фиксации, в основу которого положено воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химические способы, предусматривающие применение средств, вызывающих коагуляцию белков

Физический способ фиксации. Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за ребра мазком кверху и плавным движением проводят 2-3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с. Надежность фиксации проверяют следующим простым приемом: свободную от мазка поверхность предметного стекла прикладывают к тыльной поверхности левой кисти. При правильном фиксировании мазка стекло должно быть горячим, но не вызывать ощущения ожога.

Химический способ фиксации. Для фиксации мазков применяют химические вещества такие как: Безводный метиловый спирт. Этиловый (винный) спирт 96%. Жидкость Никифорова (смесь спирта и наркозного эфира в соотношении 1:1). Жидкость Карнуа (спирта 96% 60 мл, хлороформа 30 мл, уксусной кислоты ледяной 10 мл)

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом и затем высушивают на воздухе.

Техника окраски мазков. Для окраски мазков пользуются растворами красок или красящей бумагой, что предложено А.И. Синевым. Простота приготовления, удобство применения, а также возможность хранения красящих бумаг в течение долгого времени явились основанием для широкого их использования при различных способах окраски.

Приготовление красителей

Наиболее часто в микробиологической практике используются следующие анилиновые краски: фуксин (основной), метиловый красный, нейтральный красный — в растворе имеют красный цвет; карболовый кристаллвиолет, метилвиолет, генцианвиолет, готовая жидкая краска Гимза (азур-эозин) фиолетового цвета; метиленовая синь, бриллиантовая и малахитовая зелень.

Из сухих кристаллических или порошкообразных красителей готовят водные или спиртовые растворы красок. Последние обычно готовят впрок, так как они хорошо сохраняются в темноте (посуда из темного стекла, темное помещение). Для усиления действия красящих растворов на микробную клетку используют различные протравители, которые добавляют в раствор красителя (фенол, едкий калий) или ими

обрабатывают препарат перед окрашиванием (слабые растворы соляной, серной или хромовой кислот). Также с целью протравливания препарат с налитой на него краской прогревают или заливают предварительно подогретым раствором краски. Краски, нестойкие в растворе, не сохраняющиеся длительное время, готовят только непосредственно перед употреблением в виде 1-2% -ного раствора.

Спиртоводные растворы. *Карболовый фуксин (фуксин Циля)*. Кристаллы основного фуксина предварительно растворяют в 96% -ном этиловом спирте. Сначала готовят насыщенный спиртовой раствор (на 5-10 г краски 100 мл спирта). Для лучшего и более быстрого растворения кристаллы краски предварительно растирают в фарфоровой ступке в небольшом количестве спирта с добавлением нескольких капель глицерина. Чисто спиртовой раствор для окраски непригоден, поэтому готовят спирто-водный раствор: к 10-20 мл насыщенного спиртового раствора фуксина добавляют 100 мл дистиллированной воды с 5% фенола (протрава). Полученный раствор фуксина фильтруют через фильтровальную бумагу. В ряде случаев фуксин Циля перед использованием разбавляют еще раз дистиллированной водой (1:10) и получают его рабочий раствор (фуксин Пфейффера).

Карболовый кристаллвиолет, метилвиолет, генцианвиолет. Первые два красителя в растворе очень быстро выпадают в осадок и при окрашивании могут исказить микроскопическую картину. Чаще используют генцианвиолет, который получают смешением метил- и кристаллвиолета с добавлением декстрина; он дает более ровное окрашивание. Для приготовления спирто-водного раствора 1 г сухого генцианвиолета растворяют в 10 мл спирта, растирая в ступке с глицерином и кристалликами фенола (2%), затем добавляют дистиллированную воду. Чтобы избежать образования осадка при хранении раствора, листы фильтровальной бумаги пропитывают насыщенным спиртовым раствором краски, высушивают их на воздухе, нарезают мелкими полосками или квадратами и сохраняют в темной банке с притертой пробкой.

При окраске препарата на него накладывают высушенную полоску с генцианвиолетом, сверху наливают несколько капель воды, выдерживая 2-3 мин.

Раствор метиленовой сини (щелочная синь Леффлера). Для приготовления раствора 3 г краски настаивают длительное время (3-4 мес.) в 100 мл 96% -ного спирта, затем 30 мл насыщенного раствора разбавляют в 100 мл дистиллированной воды, содержащей 1 мл 1%-ного раствора едкого калия (протрава). Фильтруют.

Водные растворы. *2%-ный сафранин*: 2 г сухого красителя зали-

вают 100 мл горячей дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр и сразу используют свежий раствор для окрашивания.

1%-ный раствор малахитовой зелени: 1 г кристаллической краски растворяют в 100 мл горячей дистиллированной воды, фильтруют ее, остужают и используют для окрашивания.

Готовую жидкую краску азур-эозин (краска Гимза) применяют при специальных методах окрашивания бактериальных препаратов. Перед употреблением ее необходимо разбавить дистиллированной водой (1:10), но при этом сразу образуется осадок. Чтобы последний не влиял на препарат, окрашивание проводят, по рекомендации Романовского, следующим образом: на дно чашки Петри кладут стеклянные палочки или спички с обломанными головками, на них помещают препарат мазком вниз, раствор краски подливают под препарат (метод Романовского-Гимза).

Методы окрашивания микроорганизмов

Простой метод окраски. При данном методе используют только один краситель. На фиксированный препарат, помещенный на мостике над сливной чашкой, наливают раствор метиленовой сини (окрашивают 4-5 мин), либо карболовый фуксин Пфейффера (1-2 мин), либо карболовый генцианвиолет (1-2 мин). Краску смывают водой из бутылки, препарат высушивают фильтровальной бумагой и наносят каплю иммерсионного масла. Готовый препарат помещают на предметный столик и микроскопируют.

Сложные (дифференцирующие) методы окраски. Они отличаются от простых методов тем, что препарат окрашивают несколькими красками, а в отдельных случаях используют еще специальные реактивы (раствор Люголя, кислоты и др.). Сложные методы позволяют выявить наличие (или отсутствие) отдельных структурных элементов и некоторых органических соединений клетки, чем и определяют тинкториальные свойства каждого вида микроба.

Метод окраски по Граму. Фиксированный препарат окрашивают карболовым генцианвиолетом в течение 2-3 мин. Не смывая водой, краску сливают и на 2-3 мин на препарат наносят раствор Люголя (йода кристаллического — 1 г; йодистого калия как растворителя йода — 2 г; дистиллированной воды — 300 мл). Раствор Люголя сливают; препарат, не промывая водой, обрабатывают 96% -ным спиртом в течение 30 с, затем хорошо промывают водой. После этого препарат дополнительно окрашивают рабочим раствором фуксина (до 1 мин), вновь промывают водой, сушат фильтровальной бумагой и микроскопируют.

При окраске по Граму одни виды бактерий не обесцвечиваются спиртом после первичного окрашивания и сохраняют фиолетовый цвет;

их называют *грамположительными*. Другие виды обесцвечиваются спиртом, а затем воспринимают дополнительную окраску фуксином и приобретают розово-красный цвет; их называют *грамотрицательными*. Окрасивание по Граму обусловлено структурными особенностями клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных групп микробов, длиной и формой ее пор, неодинаковым химическим составом и строением пептидогликанового слоя клеточной стенки микроорганизмов. Генцианвиолет (или кристаллвиолет) и нуклеиновые кислоты цитоплазмы в присутствии йода (раствор Люголя) образуют прочный комплекс, нерастворимый в воде и слабо растворимый в спирте. Поэтому при действии спиртом в течение 30 с бактерии с многослойным пептидогликановым каркасом (грамположительные) не обесцвечиваются. У грамотрицательных бактерий пептидогликановый слой имеет более крупные поры, что облегчает прохождение спирта; образовавшийся комплекс разрушается, клетка обесцвечивается.

Методы окраски кислото-, спирто-, щелочеустойчивых бактерий. Микробы данной группы (микобактерии туберкулеза, паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота, проказы человека и др.) принадлежат к грамположительным бактериям. Для их дифференциации применяют специальные методы окрашивания, основанные на различной химической структуре цитоплазмы и клеточной оболочки. В состав этих бактерий входит значительное количество жировых веществ, в частности стеариновых кислот (в том числе фтиновой кислоты до 40%), поэтому они трудно воспринимают краски. Но если они окрасились при воздействии протравителя, то трудно уже обесцвечиваются кислотами, спиртами и щелочами.

Наиболее распространенным методом окраски бактерий данной группы является *метод Циля-Нильсена*. На фиксированный препарат кладут кусок белой фильтровальной бумаги (для предохранения от осадка), на него наливают раствор карболового фуксина, снизу препарат подогревают над пламенем до появления паров и оставляют на «мостике» (5-7 мин). Затем краску с бумажкой сливают (не промывая) и обесцвечивают 3-5% -ным раствором серной кислоты (5-7 с), хорошо промывают водой и дополнительно окрашивают метиленовой синью Леффлера (4-5 мин). Далее препарат промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой. Кислотоустойчивые (спирто-, щелочеустойчивые) бактерии окрашиваются в красный цвет (не обесцвечиваются кислотой), а некислотоустойчивые — в синий, так как легко окрасившись фуксином, они легко обесцвечиваются кислотой и воспринимают вторичную окраску синью.

Методы окраски непостоянных элементов микробной клетки.

В структуре микробной клетки различают постоянные и непостоянные элементы. Постоянные — это цитоплазма, оболочка, ядерное вещество; непостоянные — спора, капсула, жгутики, которые при определенных условиях формируются лишь у бактерий отдельных видов, поэтому служат видовым признаком.

Окраска спор. Палочковидные микробы, образующие во внешней среде (почве, воде, кормах, на питательных средах) стойкую форму существования — спору, называют бациллами. При спорообразовании в клетке происходят процессы, обуславливающие сгущение цитоплазмы, уменьшение свободной воды (до 40%). Цитоплазматическое содержимое покрывается многослойными оболочками, химический состав которых обеспечивает высокую стойкость споры к нагреванию, высушиванию, действию многих кислот, щелочей, красителей. При законченном спорообразовании спора лежит свободно, без остатков вегетативной клетки; при незаконченном процессе спора, в зависимости от вида микроба, располагается либо в центре клетки, либо на конце (терминально), либо между концом и центром клетки (субтерминально). При микроскопировании препаратов, окрашенных простым методом или по Граму, видна окрашенная вегетативная часть клетки и неокрашенные, хорошо преломляющие свет споры.

Метод Ауески. Высушенный на воздухе препарат, не фиксируя, протравливают 0,5% -ной соляной кислотой с подогреванием (2-3 мин), охлаждают, промывают водой и фиксируют над пламенем. Затем на препарат кладут кусочек фильтровальной бумаги, наливают на него карболовый фуксин Циля, окрашивают с подогреванием до паров (7-8 мин), краску сливают, препарат обрабатывают 5% -ным раствором серной кислоты (5-7 с), хорошо промывают водой. Дополнительно окрашивают метиленовой синью (4-5 мин), опять промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. Микроскопируют под иммерсией: вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Меллера. Фиксированный на пламени препарат протравливают 5% -ной хромовой кислотой (2-3 мин), промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой. Далее поступают, как в предыдущем методе. Результат окраски тот же: вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Златогорова. Процесс окраски, как в предыдущих двух методах, только без протравы. После окрашивания вегетативная часть клетки — синяя, споры — красные.

Метод Пешкова. Мазок фиксируют, красят метиленовой синью с подогреванием до кипения, смывают, смывают. Докрашивают 1%-ным водным раствором нейтральрота (10 с), смывают, просушивают. Споры окрашиваются в синий цвет, вегетативные клетки — в красный.

Окраска капсул. Капсула — производное наружного слоя оболочки. Представляет собой муциноподобное вещество, высокомолекулярный полисахарид. У патогенных капсулообразующих бактерий наличие капсулы наблюдают только в инфицированном организме как защитное приспособление против фагоцитоза (на искусственных питательных средах капсулы образуются лишь при добавлении кровяной сыворотки или дефибринированной крови). Капсулообразование отмечают у возбудителей сибирской язвы, злокачественного отека, диплококковой септицемии. Капсульное вещество плохо окрашивается, поэтому для его выявления применяют специальные методы окраски, основанные на явлениях метакромазии.

Метод Михина. Фиксированный мазок из крови или препарат отпечаток из ткани органа (печени, селезенки, почки) окрашивают метиленовой синью с подогреванием до появления паров (5-7 мин). Краску сливают, быстро промывают водой (можно не промывать), просушивают фильтровальной бумагой. Микробная клетка окрашивается в синий цвет, капсула - в светло-розовый.

Метод Романовского-Гимза. Фиксированный препарат окрашивают, как было указано выше: мазок-препарат помещают в чашку Петри на стеклянные или деревянные палочки отпечатком вниз, под препарат подливают краску, окрашивают 40-50 мин. Результат тот же, что и при окраске по Михину: микробная клетка окрашивается в синий цвет, капсула — в светло-розовый.

Метод Ольта. Свежий водный 2% -ный раствор сафранина наливают на препарат и выдерживают 5-7 мин. Затем слегка промывают водой и высушивают. Вегетативная клетка — кирпично-красного цвета, капсула — желто-оранжевого.

Контрольные вопросы

1. Какие условия необходимо соблюдать при взятии культуры для мазка?
2. Какие препараты применяются в микробиологии для изучения морфологии микроорганизмов?
3. Каковы цели фиксации мазка?
4. Как готовят прижизненные препараты микроорганизмов?
5. Основные краски, предназначенные для окраски мазков.
6. Назначение и способы простого метода окрашивания.
7. Значение сложных методов окраски микробов при бактериологическом исследовании с использованием микроскопии.
8. Сущность, техника и практическое значение окраски по Граму.

9. Методы окраски для выявления кислотоустойчивых бактерий и спор.

10. Значение и сущность окраски по Романовскому — Гимза.

11. Методы выявления капсул у капсулообразующих бактерий.

12. На чем основаны методы окраски капсул?

13. В чем суть окраски по Гинсу-Бурри?

ТЕМА 6

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ. ТЕХНИКА ПОСЕВА МИКРОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Требования, предъявляемые к питательным средам

1. В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы;

2. Среда должна быть сбалансирована по химическому составу. Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношению органических элементов - C:N должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке;

3. Среда должна иметь достаточную влажность, обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.

4. Среда должна иметь определенное значение рН среды. Среди микроорганизмов различают *ацидофилы* (кислотолюбивые микроорганизмы), *алкалофилы* (щелочелюбивые микроорганизмы) и *нейтрофилы* (лучше всего растут в нейтральной среде с рН около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. рН является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения рН в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), СаСО₃ (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например: аминокислоты, полипептиды, белки) и др.;

5. Среда должна быть *изотоничными* для микробной клетки, т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.

6. Среда должна обладать определенным *окислительно-восстановительным потенциалом* (r_{h_2}), определяющим насыщение ее

кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают $gh_2=41$, насыщенный водородом $gh_2=0$. Облигатные анаэробы размножаются при gh_2 не выше 5, аэробы – не ниже 10.

7. *Среды должны быть стерильными*, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Классификация питательных сред

По составу различают синтетические и натуральные питательные среды.

Синтетические среды представляют собой водные растворы определенных химически чистых соединений в установленных дозировках, т.е. их состав полностью известен. Однако лишь для немногих, не требовательных к питанию микроорганизмов, используют синтетические питательные среды.

Натуральные или *естественные* среды состоят из продуктов растительного или животного происхождения и имеют сложный неопределенный химический состав. К ним относятся мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА), солодовое сусло и сусло-агар, обезжиренное или гидролизованное молоко, отвары различных овощей и т.д.

По целевому назначению питательные среды делят на основные, элективные и дифференциально-диагностические.

Основными являются среды, которые применяют для выращивания многих бактерий. Это МПБ, триптические гидролизаты мясных, рыбных продуктов, казеина. Такие среды служат основой для приготовления сложных питательных сред

Элективные среды предназначены для избирательного выделения и накопления микроорганизмов определенного вида (или определенной группы) из объектов, содержащих разнообразную микрофлору. Сопутствующие микроорганизмы или совсем не растут на таких средах, или развитие их сильно подавлено. Разработка элективных сред основана на биологических особенностях, отличающих данные микроорганизмы от многих других.

Дифференциально-диагностические среды позволяют по возможности быстро установить и отличить (дифференцировать) одни виды или группы микроорганизмов от других. Их состав подбирается с таким расчетом, чтобы он позволил четко выявить наиболее характерные свойства данного вида. Часто это достигается введением в среды специальных красителей-индикаторов, которые окрашивают колонии

выявляемых микроорганизмов в определенный цвет. В частности, для культивирования бактерий группы кишечной палочки используют дифференциально-диагностические среды Эндо, Плоскирева, Левина и др.

По физическому состоянию среды разделяют на жидкие, полужидкие, плотные, сухие.

Жидкие среды (бульоны) используют для накопления биомассы микроорганизмов или продуктов их метаболизма, а также для выявления физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов.

Полужидкие среды содержат от 0,08 до 0,7 % агара.

Плотные среды готовят из жидких путем добавления к ним желеобразующих веществ – желатина или агара (1,5–2,0 %). Оба эти вещества при растворении в горячей воде образуют коллоидный раствор, дающий при охлаждении плотный студень (гель). Студнеобразные среды можно вновь расплавлять нагреванием. Плотные среды используют для выделения чистых культур микроорганизмов, в диагностических целях (описание выросших на среде колоний), для количественного учета микроорганизмов, определения антагонистической, протеолитической активности и т.д.

Сухие питательные среды, выпускаемые специальными предприятиями, используют в микробиологических целях путем добавления в них воды с последующей стерилизацией.

Техника посевов микроорганизмов на питательные среды

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические петли, иглы, шпатели, пипетки. Посевы всегда проводят около пламени горелки. Около работающего с чистой культурой нельзя делать резких движений, ходить, кашлять и т.п., так как движение воздуха увеличивает опасность попадания посторонних микроорганизмов в пробирку с культурой. Поэтому посевы и пересевы микроорганизмов рекомендуется проводить в боксе.

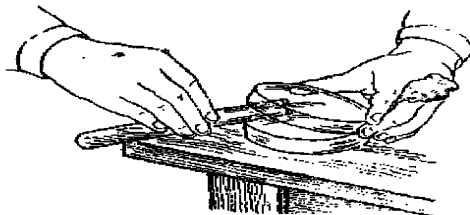


Рис. 19. Правила разливания питательной среды в чашки Петри

Посев в жидкую питательную среду. Посев производят петлей или градуированной пипеткой. Посевной материал бактериологической петлей осторожно вносят в пробирку и легко встряхивают в верхнем слое питательной среды или растирают по стенке, смывая его жидкой средой.

Стерильную пипетку фламбируют (обжигают) в пламени горелки, опускают в пробирку с культурой, отбирают определенное количество материала и переносят его в пробирку со свежей питательной средой, выпуская жидкость по стенке пробирки, или вносят пипетку вглубь среды и выдувают содержащийся в ней материал.

Посев штрихом в пробирку со скошенным агаром (рис.22). Пробирку с культурой и пробирку со скошенным питательным агаром берут в левую руку и держат в наклонном положении. В правую руку берут бактериологическую иглу и прокаливают ее в пламени спиртовки до покраснения, затем пронесают сквозь пламя иглодержатель. Мизинцем правой руки вынимают пробки из обеих пробирок, обжигают края пробирок. Петлю вводят в пробирку с культурой, охлаждают ее о края пробирки и осторожно снимают небольшое количество микробной культуры. Петлю с посевным материалом быстро переносят в пробирку со стерильной средой и опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной влаги. Слегка касаясь агара, проводят зигзагообразную линию, при этом петлю не отрывают от поверхности питательной среды. После посева петлю вынимают из пробирки и обжигают вместе с остатками посевного материала.

Затем обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают. На наружной поверхности пробирки пишут дату посева и наименование культуры.

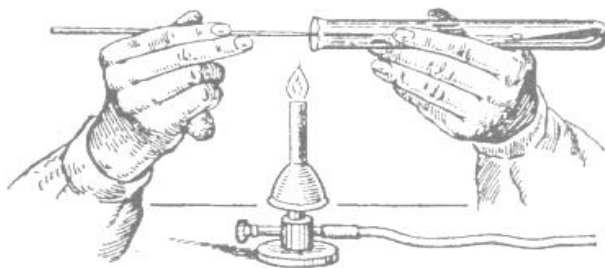


Рис. 20. Посев микроорганизмов «штрихом» на скошенный агар

Посев уколом (рис. 21). Профламбированной бактериологической иглой берут исследуемую культуру. Пробирку со столбиком пи-

тательной среды берут в правую руку, переворачивают вверх дном, вынимают из нее пробку, прижимая ее мизинцем к ладони. Подняв пробирку на уровень глаз, в центре столбика прокалывают плотную среду иглой снизу вверх на всю глубину. Затем иглу извлекают и обжигают вместе с остатками посевного материала, пробирку закрывают пробкой, подписывают и помещают в термостат для выращивания.

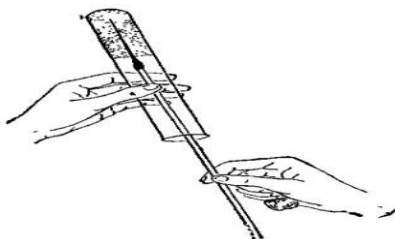


Рис. 21. Посев уколом на плотную питательную среду

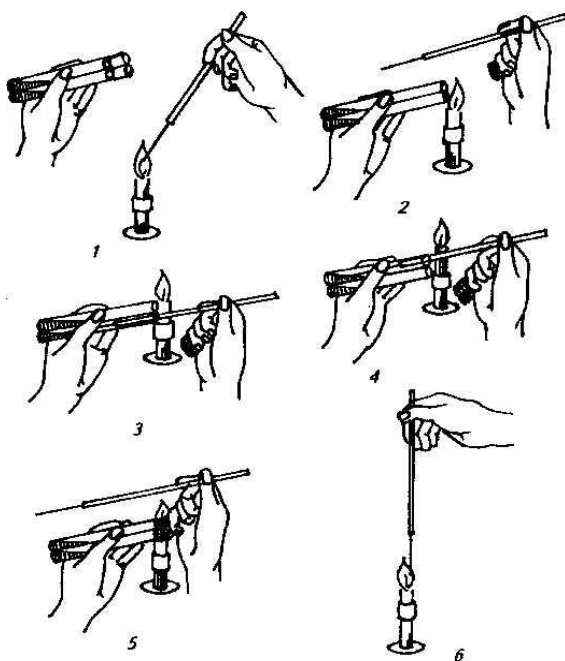


Рис. 22. Пересев культуры микроорганизмов в пробирки

Посев на поверхность среды в чашку Петри (рис. 23). В чашки Петри заливают расплавленный агар, дают ему застыть и подсушивают в термостате. Посев проводят бактериологической петлей или шпателем Дригальского (стеклянная палочка, согнутая в виде треугольника). При использовании петли посев осуществляют штриховым методом. Крышку чашки Петри слегка приоткрывают настолько, чтобы в образующуюся щель проходила петля. Петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее, и наносят микробную культуру зигзагообразными движениями (штрихом) по всей поверхности агара, не отрывая от среды, что дает возможность получить изолированные колонии.

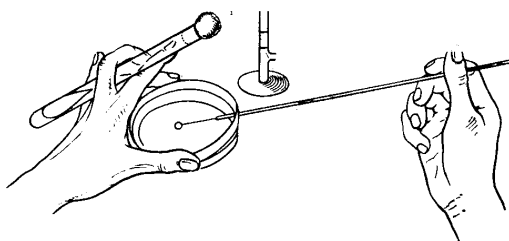


Рис. 23. Посев на плотную питательную среду в чашки Петри

Посевы «газоном» производят шпателем. Для этого, приоткрыв левой рукой крышку чашки Петри, петлей или пипеткой наносят посевной материал на поверхность питательного агара. Затем проводят шпатель сквозь пламя горелки, остужают его о внутреннюю сторону крышки и растирают материал по всей поверхности среды. После посева шпатель вынимают и обжигают вместе с остатками посевного материала. После инкубации посевов в чашке появляется равномерный газон выросшей культуры.

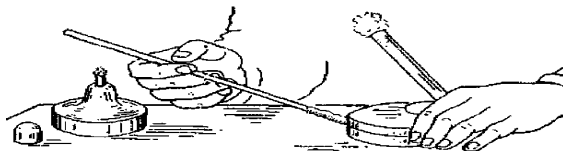


Рис. 24. Посев на агар в чашки Петри шпателем Дригальского

Глубинный посев в чашку Петри. Определенное количество подготовленного к посеву исследуемого материала (1,0 или 0,1 см³) вносят пипеткой в пустую чашку Петри. Из пробирки или колбы с расплавленной и остуженной до 45 °С питательной средой вынимают пробку, обжигают края в пламени горелки и, слегка приоткрыв крышку, выливают на дно чашки.

Пробирки и чашки с посевами помещают в термостат с температурой, оптимальной для конкретного микроорганизма. Как правило, мезофильные бактерии выращивают при температуре 37±1 °С, термофильные бактерии – при 40–55 °С, дрожжи и плесени – при 30±1 °С.

Культивирование и рост микроорганизмов

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется *культивированием*, а развившиеся в таких средах микроорганизмы – *культурой*. При культивировании происходит рост культуры – физиологический процесс, в результате которого увеличивается *биомасса* – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

Чистой культурой микроорганизма называют культуру, которая представлена потомством одной клетки. Естественным путем получить чистую культуру почти невозможно, поэтому ее получают искусственно. Для выделения чистой культуры используют плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии* – популяции микроорганизмов одного вида.

Перед выделением чистой культуры из какого-либо пищевого продукта или природного субстрата (например: почвы, воды), в котором данный микроорганизм находится в небольших количествах, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в элективных условиях.

Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. *Элективные* (накопительные) *условия* – условия, способствующие развитию одной культуры и ограничивающие развитие сопутствующих микроорганизмов. Создать накопительные условия можно путем использования накопительных сред. Примером элективных условий может быть повышенная температура (для выделения термоустойчивых форм бактерий), повышенная кислотность, повышенная концентрация соли и т.д.

Инкубация – культивирование микроорганизмов при определенной температуре.

Хранят чистые культуры обычно на плотных питательных средах в пробирках. При этом постоянно необходимо делать пересевы на

свежую питательную среду.

К другим способам хранения чистых культур относятся сохранение их на накопительной среде под слоем вазелинового масла и хранение в лиофилизованном состоянии (сушка под вакуумом замороженных клеток микроорганизмов).

В пищевой промышленности применяют чистые культуры дрожжей, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых бактерий, обладающих ценными свойствами для производства. В последнее время находят успешное применение многокомпонентные чистые культуры, состоящие из двух и более видов микроорганизмов.

Работа по получению и поддержанию чистых культур промышленных микроорганизмов осуществляется в научно-исследовательских лабораториях. Там они выделяются из различных субстратов, изучаются, и наиболее продуктивные, пригодные для производства, хранятся в коллекции музея чистых культур, откуда рассылаются отраслевыми научно-исследовательскими институтами на предприятия. В заводской лаборатории микробиолог подготавливает культуру для производственного цикла, проверяет ее биологическую чистоту, активность.

Способ культивирования зависит от конечной цели культивирования (целью является либо накопление биомассы, либо получение определенного продукта жизнедеятельности – метаболита).

Поверхностное культивирование заключается в выращивании аэробных микроорганизмов на поверхности жидких и сыпучих питательных сред. При этом микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании на жидких средах микроорганизмы растут в виде пленок. Осуществляется поверхностное культивирование в специальных ваннах – *кюветах*.

Глубинное культивирование проводится на жидких питательных средах, в которых микроорганизмы развиваются во всем объеме питательной среды. Сочетание питательной среды и растущих в ней микроорганизмов называют *культуральной жидкостью*. Осуществляется глубинное культивирование в специальных аппаратах – *ферментаторах*, снабженных мешалками и системой подвода стерильного воздуха для обеспечения роста аэробных микроорганизмов. *Аэрирование* – продувание стерильного воздуха через культуральную жидкость.

При *периодическом культивировании* весь объем питательной среды засевают чистой культурой, которую выращивают в оптимальных условиях определенный период времени до накопления нужного количества целевого продукта. Следует отметить, что, так как культивирование ведется на невозобновляемой питательной среде (в стационарных условиях), то клетки все время находятся в меняющихся усло-

виях. Таким образом, периодическую систему можно рассматривать как замкнутую систему.

При *непрерывном культивировании* культура находится в специальном аппарате, куда постоянно притекает питательная среда и откуда с такой же скоростью отводится культуральная жидкость. Для микроорганизма создаются неизменные условия среды, поэтому непрерывную систему можно рассматривать как открытую систему.

Поверхностное культивирование может быть только периодическим, в то время как глубинное культивирование может осуществляться и периодическим, и непрерывным способом.

При периодическом способе культивирования популяция микроорганизмов проходит 7 стадий (фаз) роста (рис. 25).

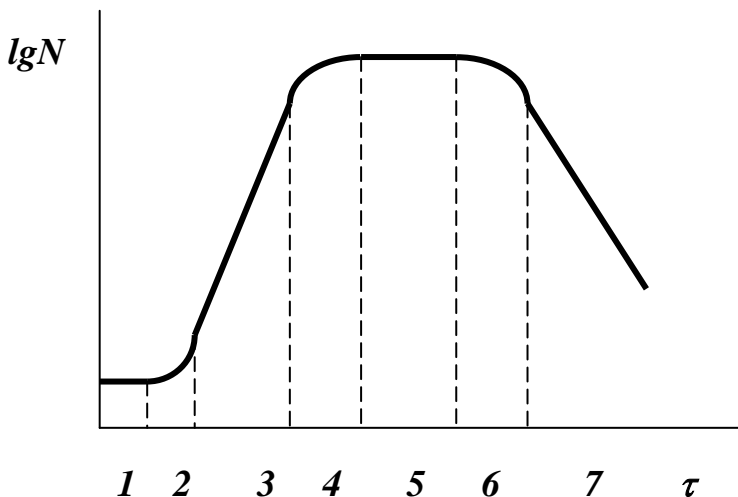


Рис. 25. Кривая роста статической культуры:
 N – концентрация жизнеспособных клеток;
 τ – продолжительность культивирования

1. *Лаг-фаза*. В этот период культура адаптируется к новой среде обитания. Активируются ферментные системы, возрастает количество нуклеиновых кислот, клетка готовится к интенсивному синтезу белков и других соединений. Клетки не размножаются (скорость размножения равна нулю). Концентрация живых клеток постоянна и равна количеству внесенных клеток. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизма и от состава питательной среды.

2. *Фаза ускорения роста*. Эта фаза характеризуется началом де-

ления клеток, увеличением общей массы и постоянным увеличением скорости роста культуры. Эта фаза обычно непродолжительна.

3. *Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста.* В этот период микроорганизмы размножаются с постоянной максимальной скоростью. При этом логарифм числа клеток линейно зависит от времени. К концу этой фазы среда истощается вследствие катаболических и анаболических процессов, в среде накапливаются продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Возникает и пространственная ограниченность, так как клетки мешают друг другу.

4. *Фаза замедления роста.* В этот период снижается скорость роста, небольшая часть клеток гибнет. Скорость роста выше скорости отмирания.

5. *Стационарная фаза.* Количество живых клеток достигает максимума. Скорость роста равна скорости отмирания клеток, поэтому концентрация жизнеспособных клеток остается постоянной.

6. *Фаза ускорения отмирания.* Количество отмерших клеток (скорость отмирания) становится больше количества образовавшихся клеток.

7. *Фаза отмирания.* Масса живых клеток значительно уменьшается, так как в среде нет питательных веществ, а запасные вещества клетки исчерпываются.

При непрерывном способе культивирования культура поддерживается в какой-то фазе роста.

Если цель культивирования – получение биомассы продуцента, процесс целесообразно вести в режиме логарифмической фазы, когда микроорганизм способен обеспечить максимальную скорость роста популяции.

Для поддержания культуры в логарифмической фазе культивирование микробной популяции проводят в условиях хемостата или турбидостата.

Рост в хемостате. Хемостат состоит из сосуда, в который вводят с постоянной скоростью питательный раствор. По мере поступления питательного раствора из него вытекает суспензия микроорганизмов с той же скоростью. При культивировании в условиях хемостата поддерживается постоянная концентрация одного из компонентов среды (например, углерода). Благодаря этому в условиях хемостата поддерживается постоянная скорость роста культуры. Культура микроорганизма находится в условиях динамического равновесия.

Рост в турбидостате. Работа турбидостата основана на поддержании постоянной концентрации живых клеток. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, а скорость роста бактерий приближается к максимальной.

Если же целью культивирования является получение метаболита (например, этилового спирта), выход которого в среду обитания не соответствует логарифмической фазе роста, применяется способ непрерывного выращивания в двух или нескольких последовательно соединенных аппаратах, что позволяет как бы расчленить процесс на несколько стадий.

Контрольные вопросы

1. Как классифицируют питательные среды по составу компонентов и назначению?
2. Какие среды позволяют получить преимущественный рост одних микробов при одновременном подавлении роста других?
3. Какими методами производят посев микроорганизмов на питательные среды?
4. Как классифицируют питательные среды по составу компонентов и назначению?
5. Что такое «культивирование»?
6. Какие способы культивирования микроорганизмов Вы знаете?
7. Чем поверхностное культивирование отличается от глубинного?
8. Что такое «чистая культура» микроорганизма?
9. Как получают и хранят чистые культуры?
10. Дать определение «накопительной культуре» микроорганизма.
11. Каким образом можно получить накопительную культуру?
12. Охарактеризовать логарифмическую фазу роста периодической культуры.
13. Как поддерживают условия хемостата при росте непрерывной культуры?
14. Как поддерживают условия турбидостата при росте непрерывной культуры?
15. Чем отличается периодическое культивирование от непрерывного?
16. Охарактеризуйте стационарную фазу роста периодической культуры.
17. Какие микроорганизмы можно культивировать поверхностным способом?
18. Каким образом осуществляется культивирование микроорганизмов глубинным способом?

ТЕМА 7 КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Культуральные свойства микробов

Культуральные признаки микробов определяются характером роста их на питательных средах. Будучи постоянными, для каждого вида микроба, они являются важным диагностическим признаком.

Рост микробов на плотной питательной среде.

Для изучения свойств колоний микробы культивируют на плотных питательных средах в чашках Петри. При посеве материала стараются получить изолированный рост колоний. Чашки с посевом просматривают сначала невооруженным глазом или через лупу, затем помещают их на столик микроскопа вверх дном и просматривают колонии в проходящем свете с объективом малого увеличения и с суженной диафрагмой. Колонии характеризуют по величине, форме, контуру края, рельефу, поверхности, цвету, структуре и консистенции.

Величина колонии определяется ее диаметром. В зависимости от диаметра различают колонии точечные (диаметр меньше 1 мм), мелкие (диаметр 1—2 мм), средние (диаметр 2—4 мм) и крупные (диаметр 4—6 мм и более).

Форма колонии бывает правильная — круглая, неправильная — амёбовидная, ризоидная — корневидная, напоминающая переплетающиеся корни деревьев (рис.28).

Характер контура края определяют при рассмотрении колонии под лупой или микроскопом с малым увеличением. Различают ровные края в виде четко выраженной линии и неровные (рис.29). Последние делят на:

1. фестончатый край, состоящий из крупных, слегка округлых или уплощенных зубцов правильной формы;
2. волнистый край, который несколько отличается от фестончатого тем, что крупные зубцы его выражены нечетко;
3. эрозированный, или зазубренный, край, состоящий из острых зубцов различной величины и формы;
4. бахромчатый край, имеющий нежные ворсинки.

В некоторых случаях четко выраженная линия, отграничивающая колонию от поверхности среды, отсутствует. Такой край колонии называется расплывчатым.

Рельеф (профиль) колонии характеризуется приподнятостью ее над поверхностью питательной среды и контуром формы в вертикаль-

ном разрезе (рис.30). Определяется рельеф колонии невооруженным глазом или с лупой при рассматривании сверху и сбоку.

Различают: 1) каплеобразные и куполообразные колонии правильной круглой формы с различно выраженной степенью выпуклости, которые в вертикальном разрезе представляют собой сегмент шара и отличаются только длиной радиуса. Колонии слабовыпуклые имеют большую длину радиуса; куполообразные — меньшую;

2) колонии плосковыпуклые с плоским верхом, пологими или круто обрывающимися краями; имеют в вертикальном разрезе форму трапеции;

3) колонии конусообразные, имеющие в вертикальном разрезе форму треугольника;

4) колонии с приподнятой в виде соска серединой и валиком по периферии;

5) колонии с вдавленным центром;

6) колонии плоские, стелющиеся по поверхности среды.

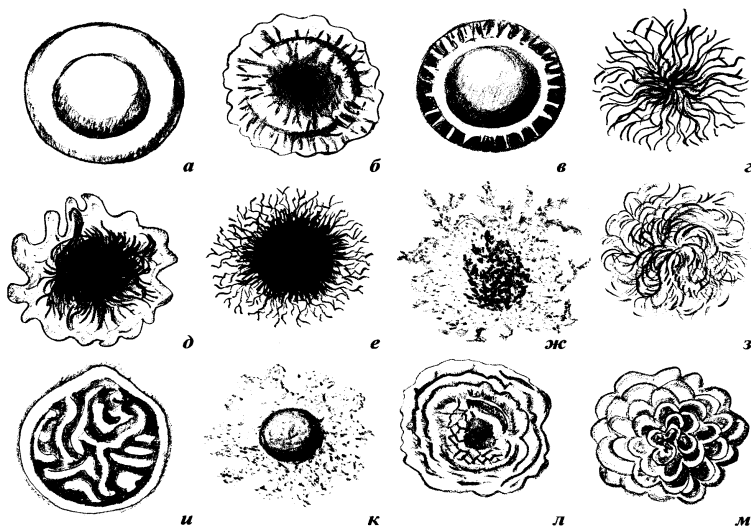


Рис. 28. Форма колоний: а – круглая; б – круглая с фестончатым краем; в – круглая с валиком по краю; г; д – ризоидная; е – с ризоидным краем; ж – амебовидная; з – нитевидная; и – складчатая; к – неправильная; л – концентрическая; м – сложная

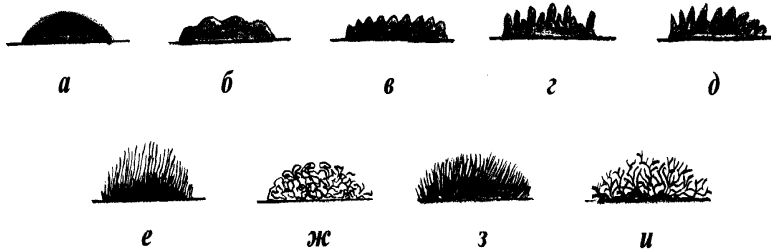


Рис. 29. Край колоний: а - гладкий; б - волнистый; в - зубчатый; г - лопастный; д - неправильный; е - реснитчатый; ж - нитчатый; з - ворсинчатый; и - ветвистый

Поверхность колонии изучают с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. Поверхность колоний бывает матовая или блестящая с глянцем, сухая или влажная, гладкая или шероховатая. Гладкие колонии обозначают буквой S (smooth), шероховатые — буквой R (rough), что означает соответственно “гладкий” и “шероховатый”. Механизм формирования гладких и шероховатых форм колоний обусловлен различием процессов клеточного деления. Микробные клетки в колониях S-форм располагаются, соприкасаясь своими боковыми поверхностями, клетки R-форм, сохраняя при делении цитоплазматические мостики, образуют цепочки, которые, накладываясь, друг на друга, обуславливают шероховатую поверхность и неровный край колонии.

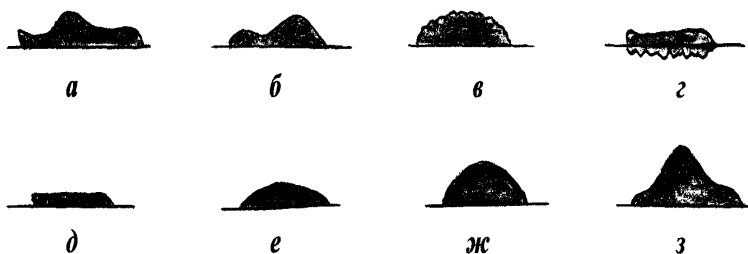


Рис. 30. Профиль колоний: а - изогнутый; б - кратерообразный; в - бугристый; г - растающий в агар; д - плоский; е - выпуклый; ж - каплевидный; з - конусовидный

Цвет колонии определяется пигментом, который продуцирует культура микробов. Преобладающее большинство патогенных бактерий пигмента не образует, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета, похожи на опал. В проходящем свете такие колонии в большей или меньшей степени прозрачны. Пигментообразующие виды микробов дают колонии различных цветов: кремовые, желтые, золотисто-оранжевые, синие, красные, сиреневые, черные и др.

Структура колоний определяется в проходящем свете при слабом увеличении микроскопа, суженной диафрагме или при несколько опущенном конденсоре. У пигментированных колоний и колоний, не пропускающих света, она не определяется.

По характеру структуры различают следующие виды колоний:

- 1) гиалиновые — бесцветные, прозрачные, без видимой определенной структуры;
- 2) зернистые, которые в зависимости от величины зерен разделяются на мелко - и крупнозернистые;
- 3) нитевидные или волокнистые, характеризующиеся наличием длинных, густо переплетающихся нитей в толще колонии.

Колонии бывают однородные и неоднородные. Строение первых одинаково во всех частях, у вторых центральная часть отличается от периферической или отдельные сектора имеют строение, неодинаковое с остальной массой.

Консистенцию колонии, определяющую ее физическое состояние, исследуют посредством прикосновения или взятия из нее части материала бактериальной петлей. По характеру консистенции колонии бывают:

- 1) пастообразные, легко снимающиеся и разрывающиеся по поверхности питательной среды наподобие сливочного масла;
- 2) вязкие или слизистые, прилипающие и тянущиеся за петлей;
- 3) волокнистые или кожистые, плотные, снимающиеся с поверхности питательной среды в виде упругой пленки, соответствующей величине и форме колонии;
- 4) хрупкие, сухие, рассыпающиеся при прикосновении петли.

Особенности микробного роста на жидких питательных средах.

На жидких питательных средах характер роста микробов менее разнообразен, чем на плотных питательных средах. Однако и здесь выявлены следующие формы роста бактерий.

1. **Рост бактерий с равномерным помутнением среды**, цвет которой остается неизменным или изменяется в соответствии с цветом водорастворимого пигмента, образующегося в культуре микроба. Такой рост характерен для многих патогенных бактерий, относящихся к группе факультативных анаэробов.

2. **Придонный рост** бактерий характеризуется образованием осадка на дне пробирки с жидкой питательной средой. Осадок может быть скудным или обильным, крошковидным, гомогенным, волокнистым или в виде крупных рыхлых хлопьев, по консистенции вязким, слизистым, хрупким или пастообразным. Питательная среда над осадком может быть прозрачной или мутной. Цвет осадка и среды, находящейся над ним, определяется наличием пигмента, продуцируемого культурой микробов. Если культура пигмента не образует, цвет среды не изменяется, а осадок приобретает, как правило, серовато-белый или желтоватый цвет. Придонный рост специфичен для бактерий с анаэробным типом дыхания.

3. **Пристеночный рост** бактерий выражается в том, что питательная среда, находящаяся в пробирке, остается совершенно прозрачной. Бактерии растут, образуя более или менее крупные рыхлые хлопья или, наоборот, компактные зерна, прикрепленные к внутренней поверхности стенок сосуда, с которых в зависимости от вида бактерий снимаются легко или с трудом.

4. **Поверхностный рост** бактерий характеризуется появлением на поверхности жидкой питательной среды пленки, внешний вид и характер которой могут быть различны:

а) пленка тонкая, нежная, бесцветная, имеет вид едва заметного налета, исчезающего при встряхивании пробирки и взбалтывании среды;

б) пленка влажная, толстая, хорошо видимая простым глазом, вязкой, слизистой консистенции, прилипает к петле и тянется за ней;

в) пленка плотная, сухая, внешним видом напоминает кусочки кожи и при попытке взятия из нее материала снимается целиком в виде круглого диска, соответствующего диаметру пробирки;

г) пленка плотная, сухая, со сморщенной, а иногда бородавчатой поверхностью, краями прикрепленная к стенкам сосуда; при взбалтывании жидкости или прикосновении бактериальной петли разбивается на кусочки, погружающиеся в глубь жидкости.

Цвет пленки, как и питательной среды, зависит от пигмента, вырабатываемого растущей культурой микробов. Рост бактерий в виде поверхностной пленки характерен для микробов-аэрофилов.

Рост на полужидкой питательной среде.

Для выявления особенностей микробного роста на полужидкой питательной среде исследуемую культуру засевают в столбик 0,2—0,5% полужидкого агара. Для того чтобы особенности роста проявились наиболее четко, прокол среды делают в непосредственной близости к стенке пробирки. Посев, произведенный таким образом, дает возможность выявить подвижные расы микробов и дифференцировать

их от неподвижных.

Подвижные микробы в столбике полужидкого агара вызывают выраженное помутнение, распространяющееся более или менее равномерно по всей толщине среды.

Неподвижные формы микробов растут только по ходу прокола среды, напоминая сосульки цилиндрической или конической формы. При этом окружающая среда остается совершенно прозрачной.

Биохимические свойства микробов

По биохимическим признакам бактерий исследуют их отношение к кислороду, ферментативную активность, способность расщеплять различные углеводы, накапливающиеся продукты метаболизма.

Отношение к кислороду воздуха. По отношению к кислороду воздуха микроорганизмы делят на облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы и облигатные анаэробы. Об отношении бактерий к кислороду судят по росту культуры при посеве уколом в столбик с питательным агаром. Аэробы развиваются в верхней части укола, анаэробы – в нижней части, а факультативные анаэробы – равномерно по всему уколу.

Среди биохимических свойств культуры наиболее важно определение их ферментативной активности.

Использование углеводов и спиртов культурами микроорганизмов определяют путем посева 0,1–0,2 см³ суспензии исследуемых клеток в пробирки с жидкой или полужидкой средой, содержащей углеводов и индикатор. Для обнаружения образования газа при расщеплении углеводов в жидкую среду опускают поплавки. Набор сред с углеводами и индикатором называют «цветным» рядом Гисса. Название «цветной» ряд связано с тем, что под действием ферментов клеток одни сахара расщепляются с накоплением кислоты или щелочи, за счет чего изменяется цвет индикатора и среды, другие сахара не расщепляются, и цвет среды не изменяется. Короткий ряд Гисса включает среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и маннитом. В длинный ряд дополнительно вводят среды с арабинозой, ксилозой, рамнозой, галактозой и др., полисахариды (инулин, крахмал, декстрин), спирты (глицерин, дульцит, инозит).

Засеянные пробирки помещают в термостат при оптимальной температуре. Результаты учитывают через 2–4 суток (для медленно растущих микроорганизмов через 7–10 суток). Отмечают изменение цвета индикатора или отсутствие изменения цвета среды, а также появление или отсутствие газа в поплавке.

На основании полученных данных делают вывод, какие сахара ассимилирует исследуемая культура бактерий.

Протеолитическая активность. Микроорганизмы, обладающие протеолитической активностью, разжижают желатину, пептонизируют молоко. Для определения этого признака культуру исследуемых бактерий засевают уколом в пробирки с желатиной и культивируют в течение 4–10 сут. при комнатной температуре, отмечая при этом скорость разжижения и его характер: послойный, воронкообразный, пузырьчатый и т.п. (рис. 31).

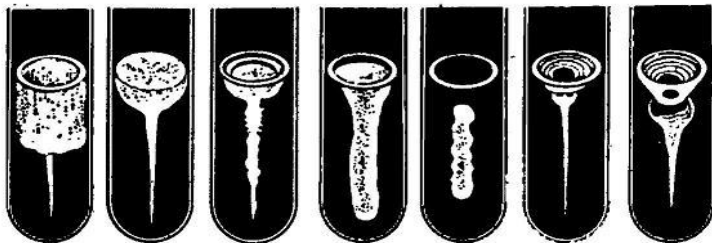


Рис. 31. Варианты разжижения желатины

Каталазная активность. Фермент каталазу образуют многие аэробные микроорганизмы. Для проведения исследования каплю 10 %-го раствора пероксида водорода наносят на 24-часовую колонию микроорганизма, выросшую на плотной среде в чашке Петри. Выделение кислорода в виде пузырьков газа свидетельствует о наличии в клетках бактерий каталазы.

Характер роста в молоке. Обезжиренное молоко разводят водой в соотношении 4:1, добавляют индикатор бромкрезоловый пурпурный (2 см³ 1,6 %-го спиртового раствора на 1 дм³ молока) или лакмус (10 см³ 4 %-го раствора на 1 дм³ молока), разливают в пробирки по 8–10 см³ и стерилизуют в автоклаве при 0,05 МПа в течение 20 мин. Пробирки с молоком засевают исследуемой культурой бактерий и культивируют 6–14 сут. при оптимальной температуре. Образование микроорганизмами кислот при расщеплении лактозы отмечают по изменению цвета индикатора. Если кислота накапливается в значительном количестве, то образуется сгусток. Бактерии, обладающие активными протеазами, расщепляют казеин, вызывая пептонизацию молока.

Образование индола. Некоторые микроорганизмы обладают способностью расщеплять аминокислоту триптофан с образованием индола, что также является диагностическим признаком при определении вида бактерий. Для определения индола применяют метод Мореля. Пробирки с 8–10 см³ стерильного мясопептонного бульона с добавлением 0,01 % триптофана (или без него) засевают исследуемой

культурой бактерий. Под ватной пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную щавелевой кислотой. Пробирки инкубируют при оптимальной температуре в течение 24 ч. При образовании индола нижняя часть полоски окрашивается в розовый цвет.

Образование аммиака. Аммонификация белковых веществ под влиянием ферментов микроорганизмов сопровождается выделением аммиака. Эту способность бактерий устанавливают путем засева исследуемой культуры в пробирки с мясопептонным бульоном, которые инкубируют в термостате при 37 °С в течение 2–3 сут. Образование аммиака устанавливают по изменению окраски полоски лакмусовой бумажки, укрепленной между пробкой и горлышком пробирки так, чтобы полоска не касалась питательной среды. Выделение аммиака определяется изменением цвета лакмусовой бумажки из красного в синий.

Образование сероводорода. При расщеплении микроорганизмами серосодержащих аминокислот (цистеин, метионин) образуется сероводород. Для определения образования сероводорода пробирки с мясопептонным бульоном засевают исследуемой культурой бактерий и под пробкой укрепляют полоску фильтровальной бумаги, пропитанную раствором ацетата свинца. Засеянные пробирки помещают в термостат при оптимальной температуре на 7–10 сут. Выделение сероводорода фиксируют по почернению полоски вследствие образования сернистого свинца.

Контрольные вопросы

1. Какие признаки используются при определении вида бактерий?
2. По каким признакам характеризуют колонии бактерий на плотной питательной среде?
3. Как характеризуется рост бактерий в жидкой среде?
4. Как выявляется у бактерий протеолитическая активность?
5. Как определить способность бактерий сбраживать сахара?
6. Какие изменения могут наблюдаться при развитии бактерий в молоке и как их объяснить?
7. По каким признакам устанавливают образование бактериями аммиака, сероводорода, индол

ТЕМА 8
МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ
АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.
ПРИНЦИПЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Выделение чистой культуры аэробных микроорганизмов

Чистой культурой микробов называют популяцию микроорганизмов, принадлежащих к одному виду, т.е. видимый рост микробных клеток одного вида, выращенных на жидкой или плотной питательной среде.

Культуры микроорганизмов одного вида, выделенные из разных источников или одного источника, называют штаммами. Кроме того, многие виды микробов отличаются друг от друга по способности ферментировать определенные углеводы, по чувствительности к специфическим бактериофагам и др. Их называют типами, или биотипами (биоварами), а по антигенным признакам - сероварами (серотипами).

Культура, полученная в результате размножения одной микробной клетки, извлеченной с помощью манипулятора или другим путем, называется клоном. Такого рода культуры используют главным образом в производственных и научно-исследовательских целях.

Бактерии одного вида, выросшие в результате размножения одной или нескольких клеток в виде изолированного скопления микробной массы, составляют колонию.

Чистые культуры микроорганизмов необходимы для изучения свойств отдельных видов, типов и даже клонов, для определения их родовой, видовой и типовой принадлежности (для идентификации), а также для приготовления лечебных (сывороток, глобулинов), профилактических (вакцин), диагностических (антигены, антитела, аллергены) препаратов, получения в производственных условиях спирта, витаминов, органических кислот (лимонная и др.), ферментов, антибиотиков и других веществ. Таким образом, выделение чистых культур является обязательным этапом любого бактериологического исследования.

Для выделения чистых культур микробов из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов в зависимости от целей использования и свойств изучаемого материала. В большинстве их чистую культуру получают из одной клетки с последующим ее пересевом.

Наиболее часто используется **метод Дригальского** - метод пластинчатого посева. Его еще называют фракционным, т.е. посевы осуществляют по частям, фракциям. Берут 4 чашки Петри с МПА (или

другой плотной питательной средой, лучше с селективной, с учетом биологических свойств выделяемого возбудителя болезни, брожения, гниения и др.), в первую из них, приподняв крышку, стерильной пастеровской пипеткой вносят каплю жидкости со смесью культур, тщательно растирают посевной материал стерильным шпателем (рис. 32) по всей поверхности питательной среды (шпатель можно приготовить на пламени спиртовки из другой или этой же пастеровской пипетки), затем шпатель с оставшимися на нем микроорганизмами переносят во вторую чашку, снова рассеивают на поверхности среды микробов и т.д. При наличии двух чашек Петри с МПА дно их делят восковым карандашом пополам на два сектора, при наличии одной - на четыре сектора. Затем чашки переворачивают, заворачивают в ту же бумагу и инкубируют в термостате при 37°C 1-2 суток. Как правило, в последнем секторе образуются отдельные колонии. Их изучают, отвивают на МПА и МПБ для идентификации вида. Причем посев производят от колоний, отличающихся друг от друга по культуральным свойствам (цвету, величине, форме и др.), так как каждый вид микробов образует характерные колонии.

Выделение чистой культуры из смеси микробов можно сделать посевом петлей-штрихом. Простерилизованной на пламени горелки и охлажденной петлей берут материал для посева и осторожно, приподняв крышку чашки Петри с МПА, вводят и на поверхности среды распределяют посевной материал смешанных культур параллельными штрихами на расстоянии 0,5 см один от другого от одного края чашки к другому, держа петлю плашмя, но не царапая питательную среду. При избытке посевного материала на петле после первых штрихов ее вводят в среду вертикально для истощения, после чего рассев продолжают. Далее поступают, как описано выше.



Рис. 32. Посев микробиологическим шпателем на МПА в чашках Петри

Метод Коха. Р. Кох в качестве плотной питательной среды использовал МПЖ, сейчас - МПА. Сущность метода: вначале готовят разведения исследуемого материала в расплавленном и остуженном до $43-48^{\circ}\text{C}$ МПА в пробирках столбиком по 12-15 мл, затем содержимое пробирок выливают в стерильные чашки Петри, среду рас-

пределяют равномерным слоем, оставляют для застывания, затем чашку переворачивают и заворачивают в бумагу. Через 1-2 суток при 37 °С в термостате на поверхности МПА в чашках, где концентрация микробов была наименьшей, вырастают изолированные колонии. Далее поступают, как при использовании фракционного метода исследований. Следует заметить, что в толще МПА аэробы тоже растут до тех пор, пока им хватает растворенного в среде молекулярного кислорода, но затем рост их приостанавливается, поэтому обнаруживают колонии очень мелкие.

Химические методы основаны на применении химических веществ, действующих на одни микроорганизмы бактерицидно, в то время как другие при этом остаются жизнеспособными, после чего производят пересев на элективные или селективные среды. Иногда химические вещества добавляют в питательные среды, что способствует задержке роста (бактериостатическое действие веществ) посторонней микрофлоры.

Метод прогрева. При необходимости выделения споровых форм материал, содержащий споры, прогревают в водяной бане при температуре 80 °С 30 мин для уничтожения истинных бактерий и вегетативных форм бацилл, после чего производят посев на питательные среды.

Биологический метод основан на заражении лабораторных и других животных с целью выделения патогенных культур после падежа: как правило, из паренхиматозных и других органов выделяют чистую культуру, т.е. организм животных служит своеобразным фильтром для болезнетворных микробов.

Выделение чистой культуры анаэробных микроорганизмов

Термин анаэробноз был введен в 1861 г. Л.Пастером, впервые открывшим анаэробный спороносный сахаро-литический микроб *Cl.butyricum*. В микробиологии различают строгие (облигатные) и условные (факультативные) анаэробы. Последние могут размножаться в питательных средах как при доступе кислорода воздуха, так и при его отсутствии. Кислород и необходимую для жизнедеятельности энергию анаэробы получают при разложении сложных органических соединений.

Анаэробноз можно создавать непосредственно в питательных средах или при помощи физических, химических, биологических и комбинированных методов защиты анаэробных посевов от атмосферного воздуха, используя специальные приборы.

Для культивирования анаэробных микроорганизмов используют жидкие и плотные питательные среды. Питательные среды должны

быть защищены от свободного доступа атмосферного воздуха и удовлетворять потребности в анаэробном обмене веществ у культивируемых микробов. Из жидких питательных сред в практике ветеринарных лабораторий наиболее широко применяют среду Кита-Тарощи. Нередко применяют и другие мясные и казеиновые гидролизатные среды (казеиново-дрожжевую, казеиново-кислотную, мясо-казеиновую, бульон Хоттингера и др.). Жидкие среды наливают в пробирки высоким столбиком, затем на поверхность настилают вазелиновое масло. Слой масла толщиной 5-8 мм предотвращает доступ атмосферного воздуха. Для редуции и абсорбции кислорода в питательные среды добавляют редуцирующие и легко окисляемые вещества: кусочки животных тканей (печень, яичный белок, мозг, мышцы, кровь), углеводы (глюкоза, лактоза), аскорбиновую и пировиноградную кислоты, цистеин, муравьинокислый натрий и др. Из плотных сред чаще всего для культивирования анаэробов используется кровяной агар с глюкозой по Цейслеру в чашках Петри, среду Вильсона-Блэра, МПА с глюкозой.

Непосредственно перед посевом патологического материала или микробной культуры жидкие питательные среды (которые могут быть подвергнуты кипячению) кипятят на водяной бане 10—15 мин для удаления воздуха, растворенного в них, и затем быстро охлаждают до + 40-45 °С.

В полужидких средах с содержанием 0,25-0,75 % агар-агара рост анаэробов достигается благодаря коллоидальному состоянию среды, поэтому особого ограждения анаэробов от атмосферного воздуха в этом случае не требуется.

Техника посева анаэробов на питательные среды в основном аналогична той, которая применяется при работе с аэробными микроорганизмами. Особенностью является то, что при этом требуется большое количество (0,3-0,6 мл) патматериала, который вносят пастеровскими пипетками в глубину среды (на жидкие - под слой вазелинового масла). На плотные и полужидкие среды можно производить посев уколом до дна пробирки. На такие среды, как МПА с глюкозой, Вильсона-Блэра, посевы обычно проводят в расплавленную и охлажденную до 45 °С среду, тщательно перемешивая ее с патматериалом. После высева среды выдерживают под струей холодной воды для ускорения застывания.

Посевы в пробирках на специальных жидких и плотных питательных средах можно выращивать в термостате без особых ограждений от атмосферного воздуха. Посевы же в чашки с кровяным агаром необходимо быстро помещать в анаэробные условия, так как строгие анаэробы при доступе кислорода быстро погибают.

Наиболее надежным и простым методом создания анаэробноза являются **физические методы**, основанные на механическом удалении воздуха из плотно закрывающихся сосудов. Для этого пользуются электрическими вакуумными насосами. Ручной насос Комовского создает небольшое разрежение, и, пользуясь им, получать рост строгих анаэробов не представляется возможным.

Для культивирования анаэробов на плотных питательных средах в чашках выпускаются специальные микроанаэроостаты (рис.33), которые представляют собой переносные металлические сосуды цилиндрической формы с герметически закрывающейся крышкой, краном для соединения с вакуумным насосом и манометром для контроля разрежения. После заполнения микроанаэроостата чашками Петри с посевами из него удаляют воздух (отрицательное давление 0,5 — 0,8 атм.) под контролем манометра, закрывают кран и переносят в обычный термостат.

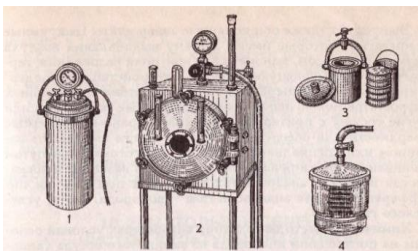


Рис. 33. Приборы для создания условий анаэробноза:
1 - анаэроостат портативный; 2 - анаэроостат стационарный;
3 - аппарат Аристовского; 4 - вакуумный эксикатор

Выпускают также стационарные анаэроостаты (вакуумные термостаты), которые имеют систему выкачивания воздуха вакуумным насосом, манометр для контроля разрежения, герметически закрывающуюся дверцу и устройство для поддержания заданной температуры. При отсутствии специальных анаэроостатов можно использовать стеклянные эксикаторы или другие сосуды с притертой крышкой и краном. Притертые поверхности для обеспечения герметичности смазывают вазелином или специальной замазкой, приготовленной путем смешивания при кипячении равных частей вазелина и воска. Иногда воздух в анаэроостатах вытесняют при помощи индифферентного для анаэробов газа - водорода, азота, углекислого газа и др.

Химические методы создания анаэробных условий основаны на поглощении кислорода из замкнутого сосуда (аппарат Аристовского, анаэроостат, эксикатор и др.) при помощи реактивов. Для этих целей чаще применяют аппарат Аристовского - металлический цилиндр,

диаметр которого соответствует диаметру чашки Петри. Аппарат герметически закрывается крышкой, внутри располагается ведро для чашек. Для поглощения кислорода используется смесь гидросульфита натрия с карбонатом натрия. Гидросульфит натрия тонким слоем насыпают в 2 чашки Петри на слой карбоната натрия и увлажняют при помощи пульверизатора. Не закрывая крышками, одну из чашек помещают на дно ведерка, вторую сверху. Между ними располагают чашки с посевами анаэробных микроорганизмов. Прибор герметически закрывают и ставят в термостат. В результате химического взаимодействия гидросульфита натрия с карбонатом натрия происходит связывание кислорода и таким образом в сосуде создаются анаэробные условия. При помощи химического метода возможно получение поверхностного роста отдельных колоний строгих анаэробов.

Биологические методы основаны на раздельном культивировании в одном сосуде анаэробов и аэробов. Например, по методу Форнера в чашку Петри толстым слоем наливают глюкозо-кровяной агар и после застывания из середины стерильно вырезают полоску агара шириной 1-1,5 см, разделяя таким образом среду на две половины. На одну из них засевают культуру облигатного аэроба (*Bas. subtilus*), на другую - культуру анаэроба или исследуемый материал. Используют и специальные чашки, дно которых разделено стеклянным валиком на две половины. Чашку герметически заклеивают лейкопластырем или заливают парафином и помещают в термостат. В первую очередь развиваются аэробные бактерии. Когда они израсходуют весь кислород, начинают размножаться анаэробы. Если культивирование происходит на жидких питательных средах, то открытые пробирки с посевами аэробов и анаэробов помещают в эксикатор, герметически его закрывают и ставят в термостат. Однако этим методом не удается получать рост строгих анаэробов и в лабораторной практике им пользуются редко.

Комбинированные методы основаны на сочетании физического с химическим или биологическим методами.

Для получения чистой культуры анаэробов используют специальные методы.

Метод Цейслера сводится к фракционному посеву на чашки с глюкозокровяным агаром. Культивирование производят в анаэробных условиях при температуре 37 — 38 °С. Получив отдельные изолированные колонии микроорганизмов, пересевают их в пробирки с МППБ.

При выделении чистой культуры спорообразующих анаэробов (*Cl. perfringens*, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum*) патологический материал вна-

чале прогревают на водяной бане при 60-65 °С в течение 30 мин или при 80 °С 10—15 мин, а затем производят посев в МППБ, культивируя в условиях термостата, и в дальнейшем поступают, как по методу Цейсслера.

Метод Виньяля—Вейона. Изолированные колонии строгих анаэробов можно получать по данному методу в МПА с 1%-ным раствором глюкозы. Для этого несколько пробирок со средой расплавляют и охлаждают до 42-45 °С, затем засевают их исследуемым материалом в разных разведениях, тщательно перемешивают и после застывания ставят в обычный термостат. Чтобы получить изолированную колонию, пробирки надпиливают и извлекают ее петлей или пипеткой. Лучшей разновидностью является метод Виньяля—Вейона, основанный на том, что подготовленный, как указано выше, материал, набирают в пастеровские пипетки или трубки Вейона (стеклянные трубки длиной 30 см, диаметром 3 — 6 мм с одного конца вытянуты в капилляр, а на другом конце, закрытом ватной пробкой, имеют перетяжку), капиллярный конец которых после заполнения засеянным агаром запаивают.

Метод Перетца. Для разведения материала запаянную пастеровскую пипетку погружают вначале в этот материал, затем в 3 пробирки с 10 мл физраствора и в 3 пробирки с 20 мл охлажденного до 45-50 °С МПА с глюкозой (10 %), к которому добавлено 0,1 мл 8%-ного раствора аскорбиновой кислоты (на 10%-ном карбонате натрия). Содержимое пробирок быстро перемешивают и выливают в 3 чашки Петри под стеклянные пластинки (6х6 см), размещенные перед стерилизацией на стеклянных палочках. Через 12-18 ч инкубирования в термостате под пластинкой вырастают колонии анаэробов. Их изучают и, сдвинув пластинку стерильным пинцетом, пересевают на другую питательную среду.

Метод заражения лабораторных животных. Животному (преимущественно морским свинкам) подкожно или внутримышечно вводят материал, содержащий анаэробные микроорганизмы. В результате оно погибает от заболевания, вызванного патогенным анаэробом. Путем посева материала из органов и тканей павшего животного выделяют чистую культуру данного микроорганизма.

Принципы идентификации

Основная задача бактериологического диагностического исследования — это определение таксономического положения выделенного микроорганизма путем сравнения его свойств со свойствами известных видов.

В рутинной бактериологической практике микроорганизм идентифицируют, изучая его фенотипические признаки (морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические, патогенные). Стали получать распространение некоторые методы идентификации по генотипическим признакам, которые ранее в основном применяли в научной работе для классификации микроорганизмов с неясным таксономическим положением.

В бактериологии для идентификации используют определители микроорганизмов. Наиболее популярный — определитель бактерий Берджи — включает в себя описание свойств известных видов микроорганизмов. Бактерии в этом руководстве по ограниченному числу морфологических и физиологических признаков объединены в большие группы. В пределах этих групп при помощи нескольких дифференцирующих признаков бактерии подразделены на семейства, роды и виды. Распределение микроорганизмов в этом определителе не отражает иерархической классификации, а преследует сугубо практическую цель — как можно быстрее и экономичнее установить таксономическое положение изучаемого микроорганизма.

Идентификация неизвестного микроорганизма представляет собой процесс последовательного его отождествления с той или иной большой группой микробов, характеризующихся и общими свойствами, затем с семейством в пределах группы, далее с тем или иным родом в пределах установленного семейства, и на конечном этапе исследуемый микроорганизм отождествляют (идентифицируют) по совокупности морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, патогенных свойств с каким-либо видом в пределах рода. В случае необходимости внутри вида устанавливают принадлежность культуры к биовару, серовару, фаговару. Работа с определителем Берджи предполагает использование достаточно большого количества тестов, характеризующих различные свойства микроорганизма. В практических диагностических лабораториях, исходя из эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, обычно проводят бактериологические исследования, заранее ориентированные на обнаружение возбудителя определенной инфекционной болезни, по схеме, предусмотренной официальной инструкцией.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятиям чистая культура, вид, штамм, тип, биовар, серовар.
2. Для каких целей получают чистую культуру микроорганизмов?

3. Какие методы выделения чистых культур вы знаете и какие из них наиболее рациональны с вашей точки зрения и почему (дайте обоснование).

4. Методы выделения чистой культуры анаэробов.

5. Методы создания анаэробных условий при культивировании анаэробных микроорганизмов.

6. Наиболее употребимые среды и принцип их изготовления для культивирования анаэробов.

ТЕМА 9 МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СРЕДСТВ

Стерилизация (от лат. *sterilis* – бесплодный) в микробиологической практике и пищевой промышленности означает уничтожение в материалах всех вегетативных клеток микроорганизмов и их спор.

Физические методы стерилизации

Фламбирование (прокаливание) – стерилизация путем прокалывания мелких предметов в пламени спиртовки или горелки (предметные стекла, бактериологические петли, иглы, пинцеты, ланцеты и т.п.). В пламени обжигают также горлышки колб, пробирок при пересевах культур и розливе питательных сред.

Кипячение применяют для стерилизации металлических инструментов, игл, резиновых трубок. Инструменты кипятят в специальных металлических стерилизаторах с крышками в течение 30–40 мин. Однако даже весьма продолжительное кипячение не обеспечивает полной стерильности объекта, так как споры ряда анаэробных клостридий могут выдерживать кипячение в течение 3 ч.

Стерилизация сухим жаром. Стеклопосуду (пипетки, пробирки, колбы, чашки Петри др.) выдерживают в сухожаровом шкафу при температуре 160...180 °С в течение 1,0–1,5 ч. При такой обработке погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов.

Посуду перед стерилизацией моют и высушивают. Пробирки и колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Пробирки заворачивают в бумагу по 10–20 штук. На колбы надевают бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли. Пипетки помещают в специальные стеклянные или металлические пеналы или заворачивают в бумагу. При работе пипетки вынимают из пенала только за верхний конец, в который вставлен тампон. Чашки Петри заворачивают в бумагу

(каждую отдельно или по 2–3 шт.). Посуду, подготовленную для стерилизации, загружают в сушильный шкаф не слишком плотно, чтобы обеспечить равномерный ее нагрев. По окончании стерилизации шкаф отключают, но не открывают до тех пор, пока температура в нем не снизится до 100...70 °С, чтобы предохранить посуду от растрескивания. Для сохранения стерильности посуду разворачивают непосредственно перед работой.

Стерилизация паром под давлением – один из наиболее распространенных и эффективных методов, основанный на том, что пар, образующийся при кипячении воды, скапливается в замкнутом пространстве и повышает давление. При увеличении давления повышается температура пара (табл. 1).

Таблица 1 - Соотношение показаний манометра и температуры насыщенного пара

Показания манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С	Показания манометра, МПа	Температура насыщенного пара, °С
0,00	100	0,15	128
0,05	112	0,20	134
0,10	121	0,30	144

Стерилизацию проводят в специальных герметически закрывающихся двустенных аппаратах – автоклавах. В автоклавах стерилизуют питательные среды, физиологические растворы, резиновые предметы, стеклянную посуду с резиновыми пробками. Режим стерилизации (температура и продолжительность обработки) определяется составом питательной среды, значением рН. Среды, содержащие сахара, молоко, витамины, стерилизуют при давлении 0,05 МПа в течение 15–20 мин, мясопептонные среды – при давлении 0,10 МПа в течение 20–30 мин. Время стерилизации отсчитывают от момента установления необходимого давления.

При низком значении рН некоторые вещества, входящие в состав питательной среды, в процессе стерилизации подвергаются гидролизу. Во избежание этого растворы некоторых компонентов (аминокислоты, витамины) стерилизуют отдельно и добавляют в среду после стерилизации.

Стерилизация текучим паром (дробная стерилизация) – метод, применяемый для обеспложивания питательных сред, изменяющих свой состав при воздействии температур выше 100 °С. Сущность дробной стерилизации состоит в том, что нагревание среды проводят при

температуре 100 °С по 15–30 мин в течение трех дней подряд. После первого прогревания погибают вегетативные клетки, некоторые споры при этом сохраняются и затем прорастают. Образовавшиеся из термостойчивых спор вегетативные формы погибают при повторном нагревании. Дробную стерилизацию проводят в аппарате Коха или в автоклаве при открытом спускном кране.

Тиндализация – дробная стерилизация материалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сыворотки, витамины, некоторые антибиотики). Стерилизацию проводят прогреванием объекта при температуре 60–65 °С в течение 60 мин подряд 5–6 дней.

Стерилизация облучением. Стерилизация ультрафиолетовыми лучами применяется для уничтожения микроорганизмов в воздухе помещений, на поверхности пищевых продуктов, на линиях упаковки. Ее проводят с помощью бактерицидных ламп различной мощности (длина волн 253–265 нм). Ионизирующее излучение применяют для стерилизации некоторых упаковочных материалов, используемых в пищевой промышленности.

Механические методы стерилизации

Фильтрование через бактериальные фильтры. Фильтрование через мелкопористые фильтры применяют в тех случаях, когда повышенная температура может резко изменить качество стерилизуемых материалов. Кроме того, стерилизация фильтрованием используется для очистки бактериальных токсинов и других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Существуют два основных типа фильтров: глубинные и мембранные.

Глубинные фильтры состоят из волокнистых материалов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в материале фильтра. Бактериальные фильтры изготавливаются из разного материала и с разным диаметром пор, что указывается на упаковке. Для стерилизации фильтрованием используют пластинчатые асбестовые фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, изготовленные из каолина с примесью кварцевого песка, свечи Беркефельда из инфузорной земли и асбеста.

Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, они состоят из нитроцеллюлозы, и захват ими частиц определяется размером пор. Мембранные фильтры обозначают номерами от 1 до 5 в зависимости от диаметра пор (350–1200 нм).

Стерилизацию фильтрованием осуществляют под вакуумом с использованием вакуумного или водоструйного насоса. Перед началом

работы фильтры закрепляют в специальном держателе, который соединяют с колбой Буэнзена. Установку для фильтрования стерилизуют в автоклаве в течение 30–40 мин при 0,15 МПа. Мембранные и асбестовые фильтры используют однократно. Свечи Шамберлана и Беркефельда после окончания фильтрования промывают дистиллированной водой, просасывая ее в обратном направлении, и обрабатывают для повторного использования.

Химические средства стерилизации

Уничтожение микроорганизмов при помощи химических веществ называется *дезинфекцией* (от лат. *infektia* – инфекция и франц. отрицательной приставки *des*). Химические вещества применяются для уничтожения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды – на рабочем месте, в помещениях, на рабочей одежде, руках, технологическом оборудовании и инвентаре.

К веществам, используемым с целью дезинфекции, предъявляется целый ряд требований:

- они должны хорошо растворяться в воде;
- в короткие сроки проявлять бактерицидное действие;
- не оказывать токсического действия на человека и животных;
- не вызывать порчу обеззараживаемых предметов.

Дезинфицирующие вещества подразделяют на несколько групп:

1. Хлорсодержащие соединения (хлорная известь, натрия гипохлорит, хлорамин, пантоцид, хлордезинсульфохлаорантин и др.).
2. Соединения на основе йода и брома (йодопирин, дибромантин).
3. Окислители (пероксид водорода, перманганат калия и др.).
4. Фенолы и их производные (фенол, лизол, креолин, гексахлорофен).
5. Соли тяжелых металлов (мертиолят натрия, сулема).

Антимикробным действием обладают также кислоты и их соли (борная, салициловая), щелочи, спирты (70 %-й раствор этанола) альдегиды (формальдегид).

Выпускаются также бактерицидные мыла: феноловое, дегтярное, «Гигиена», содержащее 3–5 % гексахлорофена.

Общая характеристика противомикробных средств

Значительное количество заболеваний человека вызывают бактерии, вирусы, грибы, спирохеты, а также некоторые гельминты. Вещества, которые обезвреживают возбудителей в окружающей среде или в организме человека, называются противомикробными средствами.

Фармакологический эффект веществ этой группы - бактериостатический (способность прекращать рост и размножение микроорганизмов) или бактерицидный (свойство обезвреживать микроорганизмы).

Противомикробные средства делят на две группы:

I. Антисептические и дезинфицирующие средства.

Препараты, не проявляют выборочной противомикробного действия и имеют значительную токсичность для человека.

Антисептические средства способны привести к гибели или прекратить рост и развитие микроорганизмов на поверхности тела человека (коже или слизистых оболочках).

Дезинфекционные средства обезвреживают патогенные микроорганизмы в окружающей среде, их применяют для обработки помещений, белья, посуды, медицинских инструментов, аппаратуры, предметов ухода за больными.

Классификация антисептических и дезинфицирующих средств

I. Антисептические и дезинфицирующие средства неорганической природы

1. Галогены (галоиды)

1.1. Препараты, содержащие хлор, - хлорная известь, хлорамин Б, хлоргексидин биглюконат, хлорантоин, натрия гипохлорид

1.2. Препараты, содержащие йод - раствор йода спиртовой, йодонатом, йодоформ (трийодметан), раствор Люголя, йод-дицерин, йодиол, повидон-йод (бетадин)

2. Окислители - раствор перекиси водорода (водорода пероксида) разведен и концентрированный, калия перманганат, бензоилпергидроксид (окси 5, 10)

3. Кислоты и основания - кислота борная, бензойная кислота, раствор аммиака, натрия тетраборат (бура)

4. Соли тяжелых металлов - ртути дихлорид (сулема), серебра нитрат, колларгол, протаргол, цинка сульфат, дерматол, ксероформ

II. Антисептические и дезинфицирующие средства органического происхождения

1. Фенолы - фенол чистый (кислота карболовая), деготь березовый, резорцин, Трикрезол, поликрезулен (ваготил)

2. Дегте и смолы - ихтиол (ихтаммол), винизоль

3. Красители - бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, этакридину лактат (риванол)

4. Производные нитрофурана - фурацилин (Нитрофурал), фуроспласт, фурагин (фуразидин)

5. Альдегиды и спирты - спирт этиловый, формальдегид (формалин), Лизоформ

6. Детергенты - мыло зеленое, Церигель, этоний, декаметоксин (септефрил), мирамистин.

III. Химиотерапевтические препараты.

Препараты, которые оказывают выборочную противомикробное действие, проявляют значительный спектр терапевтического действия их применяют для лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

Контрольные вопросы

1. Какие методы стерилизации Вы знаете?
2. Как подготовить лабораторную посуду для стерилизации?
3. Какие факторы определяют режим стерилизации?
4. В каких случаях используют химические методы стерилизации?
5. Какие требования предъявляют к дезинфицирующим веществам?
6. Какие вещества используют для дезинфекции?
7. На какие группы делят противомикробные средства?
8. Перечислите классификацию антисептических и дезинфицирующих средств?

ТЕМА 10

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЧВЫ, ВОДЫ, ВОЗДУХА

Микрофлора почвы и методы ее изучения

Почва служит благоприятной средой для развития и накопления многих видов бактерий, грибов, вирусов, простейших и представляет собой трехфазную систему, включающую почвенный воздух, почвенную влагу, минеральные и органические вещества. Вода и вещества, растворенные в ней, образуют почвенный раствор, в котором развивается большая часть всех микроорганизмов. Представители почвенной микрофлоры обитают в водных и коллоидных пленках, обволакивающих почвенные частицы.

Растительные и животные остатки, попавшие в почву, служат источником органических веществ, необходимых для питания почвенных микроорганизмов. В ризосфере (прикорневой зоне) и ризоплане (на поверхности корней), где также обитают микробы, между ними и растениями формируются особые взаимоотношения. Ряд веществ, продуцируемых растениями, а также живая масса корней представля-

ют собой хороший питательный субстрат.

Из минеральных веществ в почве присутствуют нитраты и нитриты, карбонаты, бикарбонаты, сульфаты, хлориды, соединения железа, алюминия, марганца и др. Почвенные микроорганизмы осуществляют важнейшую функцию – *минерализацию сложных органических соединений, превращая их в формы, доступные для растений, и при этом очищая внешнюю среду от отходов, поступающих в результате жизнедеятельности животных и людей*. Одновременно с разложением органических остатков микроорганизмы-автотрофы синтезируют органические соединения собственных клеток и таким образом создают в почве запасы витаминов, аминокислот и др., которые попадают в оборотный капитал природы после их гибели. В почве формируются сообщества (ценозы) с разнообразным видовым и количественным составом микроорганизмов. В богатых органикой почвах количество бактерий достигает нескольких миллиардов в 1г. Значительно меньше в почве актиномицетов, и в 1г не более 10 млн. Грибы представлены в различных почвах в количестве от нескольких сотен тысяч до нескольких миллионов в 1г. Содержание простейших в том же объеме обычно не превышает нескольких тысяч. Наличие большого количества микроорганизмов в почве служит косвенным показателем высокого ее плодородия. Наиболее заселенными являются черноземные, каштановые и сероземные почвы. *Состав микрофлоры определяется климатическими, почвенно-географическими условиями и зависит от комплекса факторов – содержания источников питания, влажности, рН, аэрации, структуры почвы, способов обработки, взаимоотношений между микроорганизмами и др.*

Основную массу почвенных микроорганизмов составляют сапрофитные и лишь незначительное количество приходится на долю патогенных видов.

Санитарное состояние почвы оценивают на основании нескольких показателей:

1 – содержания общего количества микроорганизмов (общее микробное число),

2 - наличия санитарно-показательных микроорганизмов.

Для решения ряда агротехнических вопросов проводят определение общего количества микроорганизмов, участвующих в различных процессах превращения азота и углеродсодержащих веществ (аммонифицирующих, азотфиксирующих, целлюлозоразрушающих и др.). Например, перед внесением пестицидов обязательно определяют видовой и количественный состав почвенной микрофлоры.

Для почвы санитарно-показательными организмами служат бак-

терии группы кишечной палочки (БГКП или колиформные), фекальные энтерококки, термофильные бактерии, *Clostridium perfringens*, *Proteus* spp.

Патогенные микроорганизмы выявляют в объектах внешней среды чаще всего для того, чтобы оценить эпидемиологическую ситуацию и принять необходимые меры для ликвидации источников инфекции. Следует отметить, что неспорообразующие микроорганизмы относительно быстро погибают во внешней среде, не находя там подходящих условий для жизнедеятельности. Однако даже кратковременное их пребывание может стать причиной ряда инфекций. Так, возбудители брюшного тифа, лептоспироза и др., попадающие в почву с выделениями человека и животных, сохраняются в течение нескольких недель и даже месяцев. Шигеллы – возбудители бактериальной дизентерии не теряют патогенности, выживая в почве до 3-4 мес. Наибольшей устойчивостью во внешней среде обладают микроорганизмы, образующие споры, которые сохраняют жизнеспособность на протяжении десятилетий и даже столетий. Поэтому в зонах активного земледелия почву исследуют на содержание в ней спор возбудителей столбняка, чтобы провести своевременно профилактику лиц, работающих в земледелии.

Санитарно-микробиологическое исследование почвы

При изучении микрофлоры почвы необходимо принять во внимание то, что конечные количественные показатели в большей степени зависят от метода исследования. Так, при изучении микрофлоры методом прямого подсчета по Виноградскому результаты превышают фактическое содержание микроорганизмов. Это связано с тем, что при микроскопии окрашенных препаратов, приготовленных из разведений исследуемых почвенных проб, невозможно разграничить живые и мертвые клетки микроорганизмов. Более реальную картину количества микроорганизмов демонстрирует метод количественного учета бактерий, выросших на мясопептонном агаре (МПА).

Отбор проб. Почвенные пробы в количестве от 100 до 200 г берут с одинаковой глубины (от 10 до 30 см) в 4-5 точках участка площадью 25 квадратных метров. Взятые пробы помещают в стеклянные банки или в синтетические пакеты с помощью ножа, лопаты или совка. Из глубоких слоев почву берут буром. Если бура нет, то делают вертикальный надрез почвы до необходимой глубины и ножом или лопаткой берут несколько образцов с отвесной стороны разреза из нужного горизонта. Все приспособления и тара для почвенных образцов должны быть стерильными. Отобранные образцы почвы доставляют в ла-

бораторию и проводят исследования. Анализы делают в тот же день. Допускается хранение почвы не дольше 24 ч в холодильнике при температуре 1 - 5° С.

Определение общего количества микроорганизмов в почве.

1. Метод учета на мясопептонном агаре

Образцы почвы, доставленные в лабораторию, освобождают от крупных примесей –стеклол, камней, корней и др. Крупные комочки почвы измельчают, затем образцы пропускают через сито с диаметром отверстий не более 3 мм., смешивают и из этой смеси берут навеску 10 г.

Приготовленную навеску вносят в колбу с 90 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно перемешивают взбалтыванием в течение 5-10 мин. Такая обработка необходима для того, чтобы извлечь микроорганизмы из комочков земли и с поверхности почвенных частиц. Полученную однородную взвесь отстаивают 2 мин и затем готовят из нее ряд 10-кратных разведений, последовательно перенося стерильной пипеткой по 1 мл в пробирки с 9 мл стерильной дистиллированной воды. Схема последовательных разведений почвы представлена на рис. 34. При приготовлении разведений взвесь переносят в каждую последующую пробирку новой стерильной пипеткой. Таким образом, готовят разведения до 1:1000000 и более в зависимости от того, из каких почв были взяты пробы для исследования, и их предполагаемой заселенности микроорганизмами. Для посева используют не менее двух различных разведений (обычно используют два последних, максимальных). Из каждого выбранного разведения по 1 мл вносят в 2 стерильные чашки Петри (для получения средних показателей) и заливают 15-20 мл расплавленного и охлажденного до 45°С МПА. Осторожно передвигая чашки по поверхности стола, перемешивают агар с внесенными в него разведениями почвы. После застывания питательной среды чашки инкубируют в термостате при температуре 30-35°С в течение 24 - 48 ч. Количество микроорганизмов, содержащихся в 1г исследуемой почвы, определяют следующим образом. Подсчитывают количество колоний, выросших на каждой из двух чашек, суммируют полученные результаты и делят на 2, вычисляя среднеарифметический показатель, и умножают его на степень разведения. Для подсчета берут чашки, на которых выросло от 50 до 150 колоний.

Пример. В чашках, засеянных почвенной суспензией, взятой из разведения 1: 10000, выросли в среднем 75 колоний. 75 умножаем на степень разведения - 10000 и получаем результат - 750000 бактерий. То есть такое количество микроорганизмов содержится в 1 г исследуемого образца почвы.

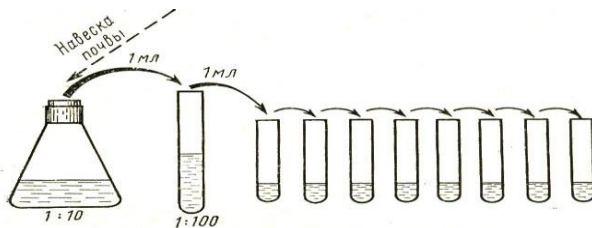


Рис. 34. Схема последовательных разведений почвы

2. Метод прямого подсчета по Виноградскому

Исходное разведение почвы готовят так же, как и при использовании первого метода определения общего количества микроорганизмов. Для дальнейшей работы берут стерильной пипеткой суспензию из разведения 1:100 и наносят 0,01 мл на обезжиренное предметное стекло на площади в 4 см^2 . Чтобы правильно распределить каплю по стеклу, под него подкладывают квадратик бумаги размером $2 \times 2 \text{ см}$. Препарат высушивают, фиксируют на пламени горелки, окрашивают по Граму и микроскопируют, используя иммерсионный объектив. При просмотре препарата подсчитывают количество бактерий, находящихся в 100 полях зрения микроскопа или 100 квадратиков окулярной сетки. Вычисляют среднее количество бактерий в одном поле зрения и затем определяют содержание микроорганизмов в 1 г почвы.

Пример. Квадратик сетки имеет площадь $0,004 \text{ мм}$ (край сетки = $0,02 \text{ мм}$), значит на 1 см он будет повторяться 25000 раз, а на всей площади препарата 100000 раз. В препарате было обнаружено, в среднем, 2 бактерии в одном квадратике. Следовательно на препарате площадью 4 квадратных сантиметра будет 200000 бактерий (2×100000).

Определение общего количества бактерий группы кишечной палочки - БГКП

1. Метод мембранных фильтров

Почвенную суспензию, приготовленную так же, как в предыдущем исследовании, (см. определение общего количества микроорганизмов в почве), разводят от 1:10 до 1:1000 при исследовании чистых почв и от 1:1000 до 1:1000000 – при изучении загрязненных почв. Затем 5 или 10 мл полученных разведений фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор не более $0,45 \text{ мкм}$ в аппарате Зейтца. Фильтры помещают на среду Эндо, в состав которой входят мясопептонный агар, лактоза и индикатор и инкубируют в термостате при температуре

37° С в течение 24 ч. При наличии бактерий группы кишечной палочки на фильтрах появляются колонии бактерий темно-красного цвета с металлическим блеском. Из колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму, и микроскопируют. БГКП имеют палочковидную форму и при окраске приобретают красный цвет (т.е. являются грамотрицательными). Затем с культурой грамотрицательных лактозоположительных бактерий ставят оксидазный тест, который позволяет дифференцировать представителей семейства Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae. Для определения оксидазной активности часть исследуемой колонии переносят стерильной петлей на фильтровальную бумагу, пропитанную диметил-п-фенилендиамином и анафтолом. У микроорганизмов, продуцирующих оксидазу, цвет колонии становится сине-фиолетовым. Бактерии группы кишечной палочки, которые являются оксидазоотрицательными не изменяют своего цвета. Дополнительно проверяют способность исследуемой культуры ферментировать глюкозу и разлагать белки. Колонии, выросшие на фильтрах на среде Эндо, учитывают как БГКП, если они образованы грамотрицательными, оксидазонегативными палочками, ферментирующими глюкозу до кислоты и газа и не разлагающими белки.

Для определения общего количества БГКП в исследуемой почве, подсчитывают количество колоний, выросших на фильтре, через который был пропущен определенный объем разведения почвенной болтушки. Затем вычисляют, сколько бактерий группы кишечной палочки содержится в одном миллилитре этого разведения. Общее количество БГКП подсчитывают, умножая показатель содержания этих микроорганизмов в 1 мл на соответствующее разведение.

Пример: Было профильтровано 10 мл из разведения 1:10000. На фильтре выросло 20 колоний. Составляем пропорцию: В 10 мл - 20 бактерий, а в одном – х. Получаем результат : $X = (20 \times 1) : 10 = 5$ бактерий. Поскольку проба для фильтрования была отобрана из разведения 1:10000, умножаем 5 на 10000. Окончательный итог – в 1 г. почвы содержатся 50000 БГКП.

Микрофлора воды и методы ее изучения

Вода также как и почва представляет собой естественную среду обитания микроорганизмов. Это обусловлено тем, что в ней находятся органические и минеральные вещества – остатки растений, останки позвоночных и беспозвоночных животных. Численность микроорганизмов зависит от ряда факторов: климато-географических, температурных, аэрации, освещенности, скорости течения, глубины, солености, показателей рН водоема и др. Содержание микробов в 1 мл воды

открытых водоисточников варьирует от десятков и сотен до десятков миллионов. Наибольший процент водных микроорганизмов составляют сапрофитные представители родов *Micrococcus*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus*, а также дрожжи и плесневые грибы. Среди них присутствуют пигментообразующие и флюоресцирующие бактерии. Вместе с тем, в воде нередко находятся и патогенные микроорганизмы, которые попадают туда с различными стоками. В таких стоках может содержаться почвенная микрофлора, испражнения людей, животных и птиц. Нередко патогенные микробы попадают в водоемы при купании, стирке белья, водопое скота. Во время дождей, особенно обильных, в водоемы могут стекать потоки с участков земли, занятых под посевы сельскохозяйственных культур.

Для патогенных микроорганизмов вода – неблагоприятный биотоп для роста и размножения. Однако некоторые из них в течение длительного времени сохраняют жизнеспособность, не теряя патогенности, и могут стать причиной инфекционных заболеваний. Было установлено, что холерный вибрион может даже размножаться в теплой прибрежной воде, богатой органическими веществами и имеющей щелочной рН. Известно, что водным путем передаются брюшной тиф, бактериальная и амёбная дизентерия, холера, лептоспироз, полиомиелит, гепатиты А и Е и ряд других болезней. При санитарно-бактериологическом исследовании воды определяют:

- *общее микробное число (общее количество микроорганизмов в 1 мл);*
- *наличие патогенных микроорганизмов;*
- *количество БГКП как показатель степени фекального загрязнения.*

Дополнительно определяют титр *Clostridium perfringens*, индекс бактериофага и наличие цист лямблий.

Наличие патогенных микроорганизмов определяют по эпидемиологическим показателям.

Исследованию подлежат: питьевая вода (водопроводная, колодезная, из артезианских скважин), вода открытых водоемов (реки, озера), плавательных бассейнов, а также сточные воды. Допустимое содержание отдельных видов микроорганизмов в различных водоисточниках регламентируется ГОСТом (государственным стандартом).

Отбор проб воды. Для взятия проб воды используют как много-разовую, так и одноразовую стерильную посуду. Много-разовая изготавливается из материалов, выдерживающих обработку сухим жаром и автоклавированием. Емкости для взятия проб воды закрывают плотными пробками и защитным колпачком из фольги или плотной бумаги.

Из открытых водоемов пробы берут обычно с глубины 10-15 см от поверхности, а из мелководных водоисточников - на уровне 10-15 см от дна. Для взятия проб используют также специальный аппарат – батометр (рис. 35,36). Он состоит из металлического каркаса, в который вставляется бутылка для воды, закрываемая плотной пробкой с приспособлением для ее открывания. Этот аппарат укреплен на тросе, позволяющем опускать его на нужную глубину. Батометры часто используются при взятии глубинных проб воды из больших водоемов.



Рис. 35. Батометр



Рис. 36. Взятие проб воды с помощью батометра

Перед взятием проб из водопровода кран протирают тампоном, смоченным спиртом, и обжигают, после чего 10-15 мин сливают застоявшуюся в трубах воду и только затем отбирают образец для исследования.

Анализ проводят сразу после взятия проб. При необходимости транспортировки воду сохраняют при температуре 1-5° С и анализируют не позднее чем через 2-6 ч с момента взятия пробы.

2. Определение общего количества микроорганизмов в воде

Общее микробное число воды определяют путем культивирования содержащихся в пробах бактерий в плотных питательных средах. В зависимости от предполагаемой загрязненности водоема перед посевом готовят десятикратные разведения исходной пробы в стерильной водопроводной воде. В таблице № 2 приведены рекомендуемые для посева разведения воды в зависимости от степени ее загрязненности (объем каждого разведения для дальнейшего посева в МПА составляет 1 мл).

Таблица 2 - Рекомендуемые для посева разведения воды в зависимости от степени ее загрязненности при определении общего микробного числа (объем каждого разведения для посева составляет 1 мл)

Тип исследуемой воды	Рекомендуемые для посева разведения воды
Водопроводная вода и вода артезианских колодцев	1мл исходной воды без разведения
Чистая вода (вода колодцев, родников и др., вода плавательных бассейнов)	1 и 1:10
Открытые водоемы, не загрязненные сточными водами	1; 1:10 и 1:100
Чистые водоемы в местах массового купания	1:10 и 1:100
Открытые водоемы, загрязненные сточными водами	1:10; 1:100 и 1:1000
Сильно загрязненные хозяйственно-бытовые воды и сточные жидкости	1:10000; 1:10 0000 и 1:100 000

Для получения разведений берут ряд пробирок, содержащих по 9 мл стерильной водопроводной воды. Исследуемую воду в объеме 1 мл вносят в первую пробирку, получают разведение 1:10, затем из этой пробирки переносят 1 мл в следующую и т.д. (см. рис.1). Для приготовления каждого разведения используют новую стерильную пипетку. Из полученных разведений вносят по 1 мл воды в 2 чашки Петри и заливают 15-20 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА. Содержимое чашек тщательно перемешивают круговыми движениями, перемещая их по поверхности стола. После застывания агара, чашки помещают в термостат на 24 ч при температуре 37°C. Колонии бактерий растут, как на поверхности питательной среды (аэробы), так и в ее глубине (анаэробы). Подсчитывают их суммарное количество и вычисляют общее микробное число. Если воду предварительно разводили, то полученную сумму умножают на степень разведения и в итоге получают количество микроорганизмов в 1 мл исходной воды.

Общее микробное число в 1 мл питьевой воды не должно превышать 50.

3. Определение бактерий группы кишечной палочки (БКГБ)

Санитарно-показательными микроорганизмами в воде, также как и в почве, являются бактерии группы кишечной палочки (БГКП). Они также называются колиформными (от лат. *Escherichia coli* - кишечная палочка.) Эта группа объединяет факультативно анаэробных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Все они имеют палочковид-

ную форму, не образуют спор, грамотрицательные, оксидазоотрицательные, разлагают лактозу до кислоты и газа. Следует обратить внимание на температуру, при которой наиболее активно проявляются сахаролитические свойства колиформных бактерий. Большинство из них сбраживает лактозу через 24-48 ч при температуре 37°C. Такие бактерии относят к общим колиформным бактериям (ОКБ).

Отличительной особенностью термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) является то, что они разлагают лактозу до кислоты и газа при более высокой температуре - 44°C в течение более короткого времени – за 24 ч. Обнаружение термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) указывает на свежее фекальное загрязнение воды. Бактерии группы кишечной палочки выявляются различными методами. Наиболее распространенным является метод мембранных фильтров.

Определение БГКП методом мембранных фильтров

Для определения БГКП этим методом используют фильтровальный аппарат Зейтца, (рис. 37), который перед началом исследования протирают тампоном, смоченным в спирте, стерилизуют прокаливанием и устанавливают на колбе Бунзена.

Затем в прибор помещают нитрацеллюлозный или ацетатцеллюлозный мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Такие фильтры предварительно стерилизуют методом кипячения. Выбранный для исследования объем воды пропускают через фильтр, присоединяя аппарат к вакуумному насосу. Если анализируют несколько проб воды, то для каждой из них используют отдельный мембранный фильтр. Перед фильтрованием новой пробы аппарат стерилизуют. После пропускания через них воды фильтры помещают на поверхность среды Эндо в чашки Петри, располагая их на питательной среде фильтрующей стороной вверх. Чашки затем инкубируют в термостате 24 ч при 37°C. В состав среды Эндо входят лактоза, индикатор и МПА и поэтому БГКП образуют на ней колонии красного цвета с металлическим отливом. Подсчитывают количество таких колоний, готовят из них мазки и окрашивают по Граму, а также проверяют оксидазную активность. Оксидазоотрицательные бактерии, разлагающие лактозу до кислоты и газа, обнаруженные на фильтре, позволяют дать положительный ответ о наличии в воде БГКП. При анализе питьевой воды вычисляют количество БГКП, содержащихся в 100 мл.

Для дифференциации ОКБ (общих колиформных бактерий) и ТКБ (термотолерантных колиформных бактерий) каждую выросшую на фильтре колонию БГКП засевают в две пробирки с лактозной средой. Одну из пробирок предварительно прогревают до 44°C с тем, что-

бы инактивировать ОКБ. Затем эту пробирку инкубируют при этой же температуре в течение 24 ч (для подтверждения наличия ТКБ). Вторую пробирку с посевом ставят в термостат при температуре 37°C на 48 ч, чтобы убедиться в наличии ОКБ.

Загрязненную воду открытых водоемов предварительно разводят, как указано в табл. № 3 и для фильтрации используют объем не менее 10 мл. Дальнейшие исследования проводят, как описано выше.

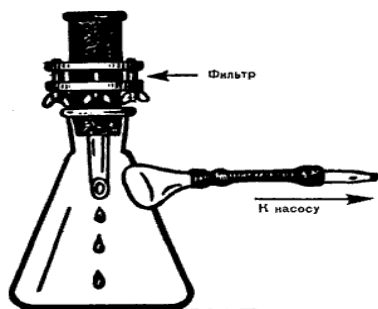


Рис. 37. Фильтр Зейтца и колба Бунзена для фильтрации воды

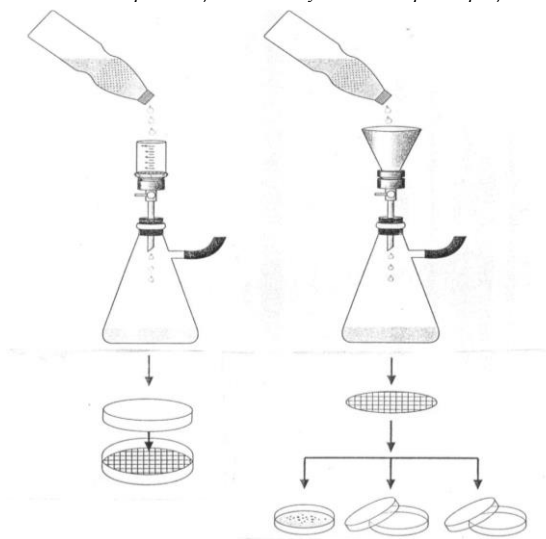


Рис. 38. Определение количества микроорганизмов методом мембранных фильтров

Определение БГКП бродильным (титрационным) методом

Этот метод известен также под названием «двухфазный бродильный метод». Для установления содержания колиформных бактерий в воде, исследуемые пробы засевают в глюкозо-пептонную среду (ГПС) для подрашивания микроорганизмов. Объемы воды при этом определяются в зависимости от водоисточника и предполагаемой степени его загрязненности.

1 этап исследования. (1 фаза) Исходный объем воды делят на несколько порций, которые засевают в различные объемы питательной среды. Например, посев воды с исходным объемом 300 мл производят следующим образом: два объема по 100 мл засевают в два флакона с 10 мл питательной среды, а 10 объемов по 10 мл той же пробы воды засевают в 10 пробирок, содержащих по 1 мл питательной среды. Посевы инкубируют в термостате при 43°C в течение 7 - 12 ч. Указанная температура подавляет рост сапрофитных микроорганизмов, но не влияет на колиформные бактерии.

На 2 этапе (2 фаза) из флаконов и пробирок, при наличии в них признаков роста (помутнение, газообразование) делают высевы петлей на чашки Петри со средой Эндо, разделенной на 3-4 сектора, и помещают их в термостат при 37°C на 18-20ч для того, чтобы получить рост изолированных колоний. Емкости с посевами воды в глюкозопептонной среде (ГПС), на которых через 7-12 ч не было признаков роста, оставляют в термостате еще на 24 - 48 ч. Отсутствие роста в них через 48 ч свидетельствует об отсутствии в воде БГКП. При просмотре посевов на среде Эндо обращают внимание на колонии красного, розового, бледно-розового цвета с металлическим блеском. Делают из них мазки, окрашивают по Граму и проверяют оксидазную активность, позволяющую дифференцировать ОКБ от других грамотрицательных бактерий. Наличие грамотрицательных, оксидазоотрицательных палочек свидетельствует о наличии в воде БГКП. Для определения термотолерантных колиформных бактерий по 2-3 лактозоположительные колонии из каждого сектора со среды Эндо засевают в пробирки с любой средой, содержащей лактозу, предварительно нагретой до 44°C и помещают в термостат на 24 ч при той же температуре. Образование в пробирках кислоты и газа свидетельствует о том, что в исследуемой пробе присутствуют термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ). Это позволяет сделать вывод о свежем фекальном загрязнении воды.

Таблица 3 - Нормативы безопасности питьевой воды в эпидемическом отношении по микробиологическим и паразитологическим показателям (по методическим указаниям «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды» МУК 4.2.1018-01)

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Общее микробное число ²	Число образующих колонии бактерий в 1 мл	Не более 50 колоний
Общее количество колиформных бактерий ²	Число бактерий в 100 мл	Отсутствие бактерий
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл ¹	Отсутствие бактерий
Колифаги ³	Число бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 100 мл	Отсутствие колифагов
Споры сульфитредуцирующих клостридий ⁴	Число спор в 20 мл	Отсутствие клостридий
Цисты лямблий ³	Число цист в 50 мл	Отсутствие цист

Примечание:

¹ Трехкратно исследуют по 100 мл отобранной пробы воды.

² Превышение норматива допускается в 5 % проб, отбираемых в точках водоразбора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 мес., при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.

³ Определяют только в системах водоснабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.

⁴ Определение проводят при оценке эффективности технологии обработки воды.

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Воздух является неблагоприятной средой обитания для микроорганизмов, так как в нем отсутствуют питательные вещества, необходимые для поддержания их жизни и размножения. Одним из важных условий для выживания в воздухе является способность микроорганизмов противостоять высушиванию, действию ультрафиолетовых и радиоактивных лучей, колебаниям температуры и др. неблагоприятным факторам. Микрофлора атмосферного воздуха формируется в основном за счет почвенных микроорганизмов, в меньшей степени они попадают в воздух с поверхности воды или растений. Поэтому наибольшее количество микроорганизмов содержится вблизи земной поверхности.

В атмосферном воздухе обнаруживаются сапрофитные микроорганизмы, представленные кокками (микрококки, сарцины и др.) споровыми бактериями (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. mesentericus* и др.), актиномицетами и грибами (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и др.). Они находятся в воздухе во взвешенном (аэрозольном) состоянии. Ме-

ханизмами самоочищения воздуха являются действие солнечных лучей, оседание бактериальных аэрозолей под действием гравитации, постоянное перемешивание и повышенная влажность (дождь, снег). Максимальное количество микроорганизмов в воздухе обнаруживают летом (июнь-август), минимальное – зимой (декабрь-январь).

Атмосферный воздух значительно отличается по количеству микроорганизмов и их видовому составу от воздуха закрытых помещений. Бактериальная обсемененность воздуха закрытых помещений всегда выше, чем атмосферного воздуха. В составе воздуха закрытых помещений помимо сапрофитной микрофлоры находятся те микроорганизмы, которые выделяет человек через дыхательные пути (при разговоре, кашле, чихании), с поверхности кожи, с пылью загрязненного постельного белья и др. источников (домашние животные, декоративные птицы). Здоровый человек при чихании выделяет в воздух 10 000-20 000 микробных тел, а больной или бактерионоситель – значительно больше. Микроорганизмы из ротоглотки человека находятся в воздухе в составе капелек слюны, которые могут часами удерживаться во взвешенном состоянии, образуя стойкие аэрозоли. Присутствие в воздухе патогенных микроорганизмов свидетельствует о санитарном неблагополучии объектов обследования, т.к. воздушно-капельным и воздушно-пылевым путем могут передаваться многие болезни (грипп, корь, дифтерия, коклюш, туберкулез и т.п.).

Для оценки санитарного состояния воздуха закрытых помещений определяют *общее микробное число и количество санитарно-показательных микроорганизмов, к которым относятся гемолитические стафилококки, α - и β -гемолитические стрептококки*. При необходимости, например в хирургических стационарах, родильных домах, дополнительно определяют наличие и количество синегнойной палочки и др. грамотрицательных условно-патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций.

Бактериальную обсемененность и количество санитарно-показательных микроорганизмов определяют по их количественному содержанию в 1 м³ (1000 литров) воздуха.

В настоящее время существует много методов и устройств для отбора проб воздуха и их исследования.

Наиболее простыми и доступными для проведения санитарно-бактериологического исследования воздуха являются седиментационный и аспирационный методы.

Седиментационный метод Коха (Koch, 1881 г) основан на спонтанном оседании микроорганизмов под действием силы тяжести на поверхности питательной среды открытой чашки Петри.

Для определения общего микробного числа две чашки Петри со стерильным МПА оставляют открытыми в течение 10-30 мин. Затем их закрывают, надписывают и инкубируют в термостате при 37°C в течение 24 час. Затем посевы выдерживают 24 час при комнатной температуре для выявления плесневых грибов. Таким образом, через 48 ч подсчитывают суммарное количество колоний, выросших на чашках. Исходят из того, что за 5 мин на поверхность 100 м² плотной среды оседают бактерии из 10 литров воздуха (Омелянский В.Л.).

Для выявления санитарно-показательных микроорганизмов используют специальные питательные среды: для стафилококков – желточно-солевой агар (экспозиция 15 мин), для гемолитических стафилококков и стрептококков – кровяной агар (экспозиция 10-15 мин), для грибов – среду Сабуро (посевы выдерживают 3-5- суток при 20-22 °С).

Аспирационный метод основан на ударном действии воздушной струи о поверхность питательной среды, на которую оседают микроорганизмы. Его проводят с использованием аппарата Кротова или его современных модификаций (ПУ-1Б и др.), которые состоят из узла для отбора проб воздуха, микроманометра и электромотора (рис. 39,40). В аппарате Кротова узел для отбора проб вмонтирован в металлический корпус и имеет центробежный вентилятор, площадку с зажимами для установки чашки Петри, крышку из плексиглаза, в которой вырезана клиновидная щель для всасывания воздуха. На площадку устанавливают открытую чашку Петри с питательной средой, закрывают крышкой аппарата и включают мотор. Вращением центробежного вентилятора воздух засасывается через клиновидную щель и с силой ударяется о поверхность питательной среды, на которой оседают микроорганизмы, равномерно распределяясь по ней. Скорость вращения чашки Петри регулируется, что позволяет пропускать разный объем воздуха в минуту, который фиксируется микроманометром. По истечении заданного времени экспозиции выключают мотор, чашку Петри с посевом воздуха снимают, закрывают и ставят в термостат.



Рис. 39. Аппарат Кротова для взятия проб воздуха



Рис. 40. Устройство автоматического отбора проб воздуха – ПУ-1Б

Считают, что для определения общего микробного числа необходимо использовать МПА, скорость пропускания воздуха через аппарат 25л/мин с экспозицией 4 мин, что гарантирует оседание микроорганизмов из объема не менее 100 л воздуха. Для обнаружения золотистого стафилококка используют желточно-солевой агар, гемолитических стафилококков и стрептококков - 3-5% кровяной агар, а время экспозиции увеличивают до 10-15 мин, что обеспечивает посев бактерий из 250-300 л воздуха.

Посев воздуха проводят в две чашки Петри с МПА или желточно-солевым агаром и выращивают 48 час (24 час в термостате при 37°C, затем выдерживают 24 час при комнатной температуре). Чашки Петри с кровяным агаром инкубируют в термостате при 37°C 24 час. Подсчитывают количество выросших колоний и полученные данные пересчитывают на 1 м³ исследуемого воздуха.

Например, на одной чашке Петри при подсчете обнаружено 246 колоний, на второй – 254, т.е. в среднем $246+254= 250$ колоний. Аппарат вращал чашку Петри 2 мин со скоростью 25 л/мин. Всего было пропущено 50 л воздуха. Таким образом в 50 л воздуха содержится 250 микробов, в общее микробное число в пересчете на 1 м³ воздуха составляет $(250 \cdot 1000) : 50 = 5000$ бактерий.

Изучение качественного состава микрофлоры проводят по обычным методикам: из колоний делают мазки, окрашивают по Граму, выделяют чистую культуру, которую идентифицируют.

При исследовании атмосферного воздуха дополнительно определяют спорообразующие анаэробы. С этой целью делают посев воздуха в объеме 200-300 л на чашки Петри с железо-сульфитной средой, инкубируют в термостате при 37°C 24 час.

Для выявления плесневых грибов посев воздуха делают на среде Сабуро и культивируют 3-5 суток при 20-22 °С.

Контрольные вопросы

1. Какие микроорганизмы называются санитарно-показательными?
2. Дайте характеристику БГКП (бактерий группы кишечной палочки)
3. Наличие каких бактерий в воде свидетельствует о свежем фекальном загрязнении?
4. Какие показатели определяют при санитарно-микробиологическом исследовании воды?
5. Что такое «микробное число» и как его определяют?

6. Какой метод используют для выявления БГКП в воде?
7. Для каких целей используют методы Коха и Кротова?
8. Назовите санитарно-показательные микроорганизмы, по наличию которых в воздухе можно определить его загрязненность
9. В чем заключается аспирационный метод и с какой целью его используют?
10. На каких средах культивируют БГКП?
11. В каких помещениях проводятся обязательные исследования воздуха с целью выявления санитарно-показательных микроорганизмов?

ТЕМА 11 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА, МАСЛА

Санитарно-микробиологическое исследование молока

Пробы для микробиологического исследования отбирают в стерильную посуду с помощью стерильных приспособлений. Объединенную пробу объемом 500 см³ составляют из точечных проб, отобранных из каждой фляги или цистерны после органолептической оценки молока и рассортировки его по кислотности.

Проба на редуктазу

Редуктазная проба является косвенным методом определения количества бактерий в молоке. Метод основан на восстановлении индикатора (метиленового синего или резазурина) окислительно-восстановительными ферментами микроорганизмов, выделяемыми в молоко. По продолжительности изменения окраски молока оценивают степень его контаминации посторонними микроорганизмами.

Редуктазная проба с метиленовым синим. В стерильную большую пробирку наливают 1 см³ рабочего раствора метиленового синего и 20 см³ исследуемого молока. Пробирку закрывают резиновой пробкой и ее содержимое смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирки. Пробирку помещают в редуктазник или водяную баню с температурой воды 37⁰С. Вода в редуктазнике или водяной бане после погружения пробирки с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Момент погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа. Наблюдение за изменением окраски ведут через 40 мин; 2,5 и 3,5 ч с начала

проведения анализа. Окончанием анализа считают момент обесцвечивания окраски молока, при этом остающийся небольшой кольцеобразный окрашенный слой сверху (шириной не более 1 см) или небольшая окрашенная часть внизу пробирки (высотой не более 1 см) в расчет не принимаются. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают (табл. 3).

Редуктазная проба с резазурином. Пробу с резазурином следует проводить не ранее чем через 2 ч после доения. В пробирку наливают 1 см³ рабочего раствора резазурина и 10 см³ исследуемого молока, закрывают резиновой пробкой и смешивают путем медленного трехкратного перевертывания пробирки. Дальнейшая последовательность анализа такая же, как и в пробе с метиленовым синим. Пробирка с молоком и резазурином на протяжении анализа должна быть защищена от прямых солнечных лучей (редуктазник следует плотно закрыть крышкой).

Наблюдение за изменением окраски проводят через 1 и 1,5 ч. По истечении 1 ч пробирку вынимают из редуктазника. Если молоко имеет серо-сиреневую окраску, пробирку оставляют в редуктазнике еще на 30 мин.

В зависимости от продолжительности изменения цвета молоко относят к одному из четырех классов, указанных в табл. 4.

Таблица 4 - Оценка степени обсемененности молока микроорганизмами по продолжительности изменения окраски молока с метиленовым синим или резазурином

Класс	Проба с метиленовым синим	Проба с резазурином		Ориентировочное количество бактерий в 1 см ³ молока, КОЕ
	Продолжительность обесцвечивания метиленового синего, ч	Продолжительность изменения, цвета ч	Окраска молока	
Высший	Более 3,5	1,5	Серо- сиреневая до сиреневой	До 300 тыс.
I	3,5	1,0	То же	От 300 до 500 тыс.
II	2,5	1,0	Сиреневая с розовым оттенком	От 500 тыс. до 4 млн
III	40 мин	1,0	Бледно-розовая или белая	От 4 до 20 млн

Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

Метод основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре 30⁰ С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения.

При исследовании сырого молока в питательную среду засевают его разведения от 10–4 до 10–6 см³. По 1 см³ каждого разведения засевают в две чашки Петри с заранее маркированной крышкой и заливают 10–15 см³ расплавленного и остуженного до 40–45⁰С мясоептонного агара (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в таком виде в термостат с температурой (30 ± 1) ⁰С на 72 ч. Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4–10 раз. При большом числе колоний и равномерном их распределении в питательном агаре дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух–трех секторах, но не менее чем на 1/3 поверхности чашки, находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см³ молока X вычисляют по формуле

$$X = n \cdot 10m,$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

m – число десятикратных разведений. За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое, полученное по всем чашкам.

Определение бактерий группы кишечных палочек

В настоящее время к БГКП относят следующие роды из семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*. Бактерии группы кишечных палочек представляют собой мелкие грамотрицательные палочки, в основном подвижные (кроме бактерий рода *Klebsiella*), не образующие эндоспор и капсул.

Они не обладают оксидазной активностью, ферментируют лактозу и глюкозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С. Исследование на присутствие БГКП в молочных продуктах проводят в несколько этапов.

Определение бродильного титра

Метод основан на способности БГКП сбраживать в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при температуре (37±1) °С в течение 24 ч. В молочной промышленности для определения бродильного титра используют среду Кесслера, в которую в качестве углевода вносят лактозу; в качестве вещества, ингибирующего рост других групп бактерий, – бычьей желчь, а в качестве индикатора – генцианвиолет. Бродильный титр в сыром молоке определяют следующим образом. В пять пробирок со средой Кесслера вносят по 1 см³ соответствующего разведения молока (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) и ставят их в термостат при температуре (37±1) °С на 18–24 ч. По окончании инкубации пробирки просматривают. При отсутствии газообразования в поплавке в пробирке с наименьшим из засеваемых объемов дают заключение об отсутствии в продукте БГКП. При наличии газообразования в поплавке в пробирке с наименьшим из засеваемых объемов считается, что БГКП обнаружены в этом количестве.

Пересев БГКП на среду Эндо. Для подтверждения принадлежности бактерий, вызвавших брожение в среде Кесслера, материал из забродивших пробирок пересевают на среду Эндо. С этой целью дно чашки Петри с застывшей средой Эндо делят карандашом по стеклу на 4 или 8 секторов. Из пробирок со средой Кесслера берут петлей немного жидкости и проводят ею расширяющимся зигзагом штрих по поверхности агара, начиная от центра сектора к краю чашки. Для получения изолированных колоний петлю не отрывают от поверхности агара. Чашки Петри переворачивают вверх дном и ставят в термостат при температуре (37±1) °С. После 24 ч инкубации определяют характер выросших колоний. На среде Эндо БГКП образуют блестящие красные или розовые колонии с металлическим блеском или без него.

Окрашивание препаратов из характерных колоний по Граму.

Не менее чем из пяти колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму. Бактерии группы кишечных палочек – граммотрицательные, неспорообразующие. Микробиологические показатели сырого молока приведены в табл. 5.

Таблица 5 - Микробиологические показатели сырого молока

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
<i>Молоко сырое</i>				
Высший сорт	1·105	–	25	Соматические клетки, не более 4·105 в 1 см ³
Первый сорт	5·105	–	25	Соматические клетки, не более 1·106 в 1 см ³
Второй сорт	4·106	–	25	Соматические клетки, не более 1·106 в 1 см ³
<i>Молоко, сыворотка, пахта пастеризованные</i>				
В потребительской таре	1·105	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 1 см ³ не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Во флягах и цистернах	2·105	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 0,1 см ³ не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
<i>Сливки пастеризованные</i>				
В потребительской таре	1·105	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 1 см ³ не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Во флягах и цистернах	2·105	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 0,1 см ³ не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Молоко топленое	2,5·103	1,0	25	<i>S. aureus</i> не допускаются, <i>L. monocytogenes</i> в 25 см ³ не допускаются
Молоко и сливки стерилизованные	Требования промышленной стерильности: 1) после термостатной выдержки при температуре 37 ⁰ С в течение трех–пяти суток – отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменений вкуса и консистенции; 2) после термостатной выдержки допускаются изменения: а) титруемой кислотности – не более чем на 2 ⁰ Т; б) КМАФАнМ – не более 10 КОЕ/см ³ (г)			

Групповой количественный учет микроорганизмов в сыром молоке

В целях детального исследования микрофлоры сырого молока проводят определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в молоке. При этом для учета отдельных групп микроорганизмов используют различные элективные питательные среды или особые условия культивирования.

Количественный учет молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии, размножаясь в сыром молоке, накапливают молочную кислоту, что приводит к повышению титруемой кислотности молока и ухудшению его технологических свойств. Для определения количества молочнокислых бактерий делают посев разведений сырого молока в чашки Петри, в которые перед стерилизацией вносят по 0,5 г тонко измельченного мела. После этого чашки заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50⁰С агаром с гидролизированным молоком. После застывания агара чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат с температурой (35± 1)⁰С на 36–48 ч. После инкубации подсчитывают количество колоний молочнокислых бактерий по зонам просветления вокруг них, которые появляются за счет образования растворимого лактата кальция.

Количественный учет протеолитических бактерий

Протеолитические бактерии разлагают белки молока с образованием пептонов и пептидов, поэтому присутствие их в молоке и молочных продуктах крайне нежелательно. Они вызывают появление в молочных продуктах горького вкуса. Метод определения протеолитических бактерий основан на их способности расщеплять белки под действием протеолитических ферментов. Для определения количества протеолитических бактерий производят посев по 1 см³ каждого из выбранных разведений молока в стерильные чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50⁰С молочным агаром.

После застывания агара чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (30±1)⁰С в течение 36–48 ч, а затем подсчитывают количество колоний протеолитических бактерий по зонам просветления вокруг них, образующихся вследствие разложения молочного белка. К наиболее распространенным протеолитическим бактериям относятся псевдомонады, палочки протей, большинство спорообразующих бактерий.

Количественный учет маслянокислых бактерий

Маслянокислые бактерии при развитии в молочных продуктах вызывают такие пороки, как вспучивание, неприятный вкус и запах

(вследствие накопления масляной, уксусной кислот и CO_2). Учет маслянокислых бактерий производят методом предельных разведений, высевая разведения исследуемого продукта в пробирки со стерильным молоком и парафином. После посева пробирки нагревают в водяной бане при температуре 85°C в течение 10 мин, охлаждают до 30°C и выдерживают в термостате при температуре 30°C в течение трех суток. Наличие маслянокислых бактерий определяют по трем признакам: – образованию газа; – запаху масляной кислоты; – наличию в микроскопическом препарате спорообразующих бактерий, имеющих форму барабанных палочек и дающих положительную реакцию на гранулезу (запасное крахмалоподобное вещество). Для обнаружения гранулезы каплю взвеси исследуемых микробов наносят на предметное стекло, смешивают с каплей раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Гранулеза, содержащаяся в клетках, окрашивается йодом в синий цвет. Определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в сыром молоке, приведено в табл. 6.

Таблица 6 - Определение основных групп микроорганизмов в сыром молоке

Определяемый показатель	Метод исследования	Используемая питательная среда	Засеваемое разведение молока	Количество чашек (или пробирок)	Результат исследования
Количество бактерий:					
молочно-кислых	Чашечный	Агар с гидролизованым молоком и мелом	4 5 6	1 1 1	
протеолитических	Чашечный	Молочный агар	2 3 4	1 1 1	
маслянокислых	Предельных разведений	Стерильное молоко с добавлением парафина	1 2 3 4	2 2 2 2	
липолитических	Чашечный	Питательный агар с говяжьим жиром	1 2 3	1 1 1	
Количество дрожжей и плесеней	Чашечный	Сусло-агар или среда Сабуро	0 1 2	1 1 1	

Количественный учет липолитических бактерий

Липолитическими называют микроорганизмы, способные разлагать жир, что приводит к появлению различных пороков вкуса и запаха молочных продуктов. Липолитически активными являются некоторые виды бактерий (чаще всего псевдомонады), дрожжи, плесневые грибы.

Для определения липолитических бактерий на дно чашки Петри заливают стерильный расплавленный говяжий жир и тут же его сливают. На дне остается тонкий слой застывшего жира. В эту же чашку Петри вносят 1 см^3 исследуемого разведения молока и заливают расплавленным и остуженным до температуры $45\text{--}50^0 \text{ C}$ питательным агаром. После застывания агара чашки с посевами выдерживают при комнатной температуре $(20\pm 2)^0 \text{ C}$ в течение пяти–шести суток. Подсчитывают количество колоний липолитических микроорганизмов, вокруг которых образовались белые зоны.

Количественный учет дрожжей и плесеней

Учет дрожжей и плесеней в молоке производят посевом соответствующих разведений молока в чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным до температуры $45\text{--}50^0 \text{ C}$ суслом-агаром или средой Сабуро. Чашки выдерживают в термостате при температуре $(30\pm 2)^0 \text{ C}$ в течение трех суток. Подсчитывают отдельно количество колоний дрожжей и колоний плесеней.

Микробиологический контроль пастеризованного молока

В питьевом молоке и сливках выборочно от одной–двух партий не реже одного раза в пять дней определяют общее количество бактерий и наличие БГКП.

Отбор проб. Пастеризованное молоко во флягах после тщательного перемешивания стерильной мутовкой отбирают черпаком в количестве $50\text{--}60 \text{ см}^3$ в стерильную посуду с пробкой. Продукты, расфасованные в потребительскую тару, отбирают по одному – два образца от партии. Кончик пакета протирают ватой, смоченной спиртом, и отрезают ножницами, предварительно профламбированными в пламени спиртовки. При контроле молока из секции охлаждения пастеризатора обжигают пробный кран и наливают молоко в стерильную посуду с пробкой.

Контроль эффективности пастеризации

Эффективность пастеризации молока и сливок контролируют вне зависимости от качества готового продукта не реже одного раза в декаду. Для этого 10 см^3 молока, отобранного после секции охлаждения, засевают в 50 см^3 среды Кесслера.

Бактерии группы кишечной палочки не должны обнаруживаться в указанном объеме молока, проба на фосфатазу должна быть отрицательной. Общее количество бактерий в 1 см^3 молока, отобранного после секции охлаждения пастеризатора, не должно превышать 10 тыс.

Определение КМАФАнМ и БГКП

В отобранных пробах молока определяют КМАФАнМ. Для посева готовят разведения продукта от 10–1 до 10–5 см³. Для определения БГКП делают посев одного, двух и трех разведений продукта в среду Кесслера.

Микробиологические показатели молока и сливок пастеризованных приведены в табл. 4

Микробиологический контроль стерилизованного молока

Для контроля стерилизованного в потоке молока отбирают для исследования по одному пакету через каждый час работы с каждого фасовочного автомата. Контроль готовой продукции осуществляют не реже двух раз в неделю. Отобранные образцы должны соответствовать требованиям *промышленной стерильности*. Для определения промышленной стерильности отобранные упаковки со стерилизованным молоком выдерживают при температуре 37⁰ С в течение трех суток, а со сливками – в течение пяти суток. После термостатной выдержки проводят осмотр образцов продукта. При наличии вздутия упаковки или изменения внешнего вида молока в бутылках (наличия сгустка, отстоя сыворотки, наличия хлопьев молока и др.) упаковки считают не отвечающими требованиям промышленной стерильности. Упаковки без внешних дефектов вскрывают, стерилизованное молоко и сливки анализируют органолептически.

Продукт отвечает требованиям промышленной стерильности, если не установлено изменений консистенции и вкуса, кислотность молока увеличилась не более чем на 2⁰Т, в микроскопическом препарате отсутствуют клетки бактерий, а общее количество микроорганизмов в 1 см³ не превышает 10. (см. табл. 3.)

Санитарно-микробиологическое исследование сливочного масла

Отбор пробы масла. Образец масла в транспортной таре отбирают стерильным щупом, предварительно сняв верхний слой, на расстоянии 3–5 см от края, направляя щуп к противоположной стороне и опуская на 3/4 его длины. Из столбика масла на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г масла и помещают в стерильную посуду. Оставшийся после отбора пробы столбик масла на щупе возвращают на прежнее место, а поверхность масла аккуратно заделывают. От партии масла в потребительской таре отбирают для анализа стерильным шпателем 15–20

г, включая поверхностный слой. Отобранную пробу помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой.

Подготовка пробы к анализу. Перед исследованием пробу масла расплавляют на водяной бане при температуре 40–45⁰ С и перемешивают для получения однородной эмульсии. Из полученной эмульсии стерильной пипеткой берут 1 см³ и вносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40⁰ С. Из полученного таким образом первого разведения готовят второе разведение. В кисломолочном масле два раза в месяц определяют наличие БГКП, патогенных бактерий, протеолитических бактерий, дрожжей и плесеней, а в сладкомолочном, кроме того, общее количество микроорганизмов (КМАФАнМ). При необходимости определяют количество липолитических бактерий. Бродильный титр определяют посевом 1 см³ продукта и его 10⁻¹ и 10⁻² разведений в пробирки со средой Кесслера. Количество протеолитических бактерий определяют посевом на молочный агар по 1 см³ разведений от 10⁻¹ до 10⁻⁴ для сладко-сливочного масла и от 10⁻¹ до 10⁻³ для кисломолочного масла. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре (30±1)⁰ С и инкубируют в течение 24 ч. Протеолитические бактерии учитывают по зонам просветления вокруг колоний, которые образуются в результате разложения белка этими микроорганизмами. Количество дрожжей и плесеней определяют посевом в чашки Петри от 10⁻¹ до 10⁻² разведений масла, которые затем заливают суслон-агаром. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в сладкомолочном масле определяют посевом в чашки Петри с МПА 10⁻²–10⁻⁴ разведений сливочного масла, кроме кисломолочного.

Контрольные вопросы

1. Перечислить факторы, определяющие гигиеническое качество сырого молока.
2. В чем сущность метода определения количества микроорганизмов по редуцтазной пробе?
3. Как определяется эффективность пастеризации молока?
4. Какие микробиологические показатели определяют при оценке качества питьевого молока?
5. Как готовят разведения молока для проведения микробиологического анализа?
6. Как проводят определение КМАФАнМ, количества грибов и дрожжей?
7. В чем сущность метода определения БГКП? Какие питательные среды используются в этом методе?

8. Микроорганизмы, обнаруживаемые в кисло- и сладко-сливочном масле в различные периоды хранения.
9. Отбор и подготовка к исследованию проб масла.
10. Подготовка к микроскопированию мазков масла.
11. Микробиологические нормы оценки масла.
12. Определение Coli - титра кисло- и сладко-сливочного масла.

ТЕМА 12

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Санитарно-микробиологический контроль кисломолочных напитков

Обор проб для исследования кисломолочных напитков производится так же, как и при исследовании пастеризованного молока: после розлива отбирают по одному – два образца в упаковке от партии. Готовую продукцию контролируют на наличие бактерий группы кишечных палочек и по микроскопическому препарату не реже одного раза в пять дней. Для определения наличия БГКП кисломолочные продукты предварительно нейтрализуют. Для этого отбирают стерильной пипеткой 10 см^3 исследуемого продукта в стерильную колбочку и добавляют 1 см^3 10 %-го раствора двууглекислого натрия. Содержимое колбочки перемешивают и засевают в три пробирки со средой Кесслера по 1 см^3 самого продукта, а также его первого и второго разведений. Для контроля состава микрофлоры готовых кисломолочных напитков просматривают микроскопические препараты, окрашенные метиленовым синим. В поле зрения препарата, приготовленного из йогурта, ряженки, простокваши «Мечниковской», «Южной», «Болгарской», должны находиться цепочки кокков и длинные тонкие палочки; из ацидофильно-дрожжевого молока – ацидофильные палочки и дрожжи; из кефира – стрептококки, короткие палочки, изредка единичные дрожжевые клетки и т. д. Микробиологические показатели кисломолочных напитков приведены в табл. 7.

Таблица 7 - Микробиологические показатели кисломолочных напитков

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (колли-формы)	<i>S. aureus</i>	Патогенные, в том числе сальмонеллы	
Жидкие кисломолочные продукты, в том числе йогурт, со сроками годности не более 72 ч	МКБ не менее $\cdot 10^7$	0,01	1,0	25	–
Жидкие кисломолочные продукты, в том числе йогурт, со сроками годности более 72 ч:					
без компонентов	МКБ не менее $\cdot 10^7$	0,1	1,0	25	Д – 50*, П – 50
с компонентами	МКБ не менее $\cdot 10^7$	0,01	1,0	25	Д – 50*, П – 50
Жидкие кисломолочные продукты, обогащенные бифидобактериями, со сроками годности более 72 ч	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$; бифидобактерии не менее $1 \cdot 10^6$	0,1	1,0	25	Д – 50*, П – 50
Ряженка	–	1,0	1,0	25	–
Сметана и продукты на ее основе	МКБ не менее $\cdot 10^7$	0,001***	1,0	25	Д – 50***, П – 50***
Термически обработанные сквашенные молочные и молочные составные продукты без и с компонентами**	–	1,0	1,0	25	П – 50

* Кроме напитков, изготавливаемых с использованием заквасок, содержащих дрожжи.

** Для термически обработанных продуктов – 0,01.

*** Для продуктов со сроками годности более 72 ч.

Санитарно-микробиологический контроль сметаны

Отбор пробы производится в стерильную посуду после тщательного перемешивания из двух–трех мест партии при крупной расфасовке (фляги, бочки), а при мелкой расфасовке отбирают два образца от партии.

Сметану нейтрализуют добавлением 10 %-го раствора двууглекислого натрия до pH 6,5–6,8, а затем готовят десятикратные разведения продукта от 10^{-1} до 10^{-4} см³ для определения БГКП. С этой целью делают посев по 1 см³ указанных разведений сметаны в четыре пробирки со средой Кесслера. Бактерии группы кишечной палочки не

должны обнаруживаться в $0,01-0,001 \text{ см}^3$ продукта (см. табл. 3). В сметане со сроком годности более 72 ч определяют количество дрожжей и плесеней путем посева 1 г продукта и его первого разведения в чашки Петри с суслон-агаром или средой Сабуро.

При просмотре микроскопических препаратов сметаны в поле зрения должны находиться молочнокислые стрептококки (в препаратах бифидосметаны – дополнительно единичные клетки бифидобактерий). Наличие посторонних микроорганизмов (термоустойчивых молочнокислых палочек, дрожжей, молочной плесени) свидетельствует о низком санитарно-гигиеническом уровне производства.

Санитарно-микробиологический контроль творога

При отборе творога из крупной тары (бочек, фляг) верхний слой продукта зачищают. Пробу отбирают стерильным щупом на расстоянии 3–5 см от края, направляя щуп к противоположной стороне и опуская примерно на $3/4$ его длины. Из столбика творога на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г творога и помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой. От расфасованных продуктов отбирают один – два образца в упаковке. Для микробиологического анализа отвешивают 10 г продукта на стерильном часовом стекле (или чашке Петри) и тщательно растирают его в стерильной или профламбированной ступке. К навеске добавляют 90 см^3 стерильного физиологического раствора, подогретого до $40-45^0 \text{ C}$, и получают разведение продукта 1:10, из которого готовят все последующие разведения. Готовый творог анализируют на присутствие БГКП в определенной массе и просматривают микроскопический препарат. Бактерии группы кишечной палочки определяют посевом по 1 см^3 разведений продукта от 10^{-1} до 10^{-5} в пробирки со средой Кесслера. Пробирки с посевами выдерживают в термостате при температуре 37^0 C в течение 18–24 ч, после чего их просматривают и определяют бродильный титр по наличию газообразования в поплавках. В микроскопическом препарате творога должны обнаруживаться молочнокислые стрептококки. Обнаруженные в препарате дрожжи, палочки, молочная плесень являются посторонними микроорганизмами. Микробиологические показатели творога приведены в табл. 8.

Таблица 8 - **Микробиологические показатели творога**

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (коли- формы)	<i>S. aureus</i>	Патогенные, в том числе сальмонеллы	
Творог и творожные изделия со сроками годности не более 72 ч	МКБ не менее 10 ⁶	0,001	0,1	25	-
Творог и творожные изделия со сроками годности более 72 ч, в том числе замороженные	—	0,01	0,1	25	Д – 100, П – 50
Творожные изделия термической обработки	—	0,1	1,0	25	Д + П – 50
Творог зерненный	—	0,01	0,1	25	Д – 100, П – 50

Контрольные вопросы

- 1 Как классифицируют кисломолочные продукты в зависимости от используемых для их производства микроорганизмов?
- 2 Какие микроорганизмы входят в состав закваски для кефира и кумыса?
- 3 Из каких видов микроорганизмов состоят закваски для творога, сметаны, простокваши, йогурта, варенца, ряженки?
- 4 Какими заквасками сквашивают молоко при производстве ацидофилина, ацидофильно-дрожжевого молока, ацидофильной пасты?
- 5 Как контролируют производство кисломолочных продуктов?

ТЕМА 13

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРОВ, МОЛОЧНЫХ КОНСЕРВОВ, МОРОЖЕННОГО

Санитарно-микробиологическое исследование в сыроделии

При контроле процесса производства сыра исследуют сырое молоко, предназначенное для выработки сыра, закваску, сычужный фермент, пастеризованное молоко и сыр. В сыром молоке, поступающем на сыродельные заводы, кроме редуцтазной пробы и наличия ингибирующих веществ, один раз в 10 дней определяют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и сычужно-бродильную пробу. В пастеризованной смеси молока из сырной ванны или сыроизготовителя не реже одного раза в 10 дней определя-

ют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и БГКП. Споры указанных бактерий не должны обнаружиться в $0,1 \text{ см}^3$; БГКП должны отсутствовать в 3 см^3 молока.

Сычужно-бродильная проба

Метод основан на способности некоторых микроорганизмов свертывать молоко в присутствии сычужного фермента. По характеру образовавшегося сгустка оценивают качество молока на его пригодность для изготовления сыра.

Чисто вымытые и высушенные широкие пробирки ополаскивают исследуемым молоком и наливают в них около 30 см^3 молока, затем в каждую пробирку вносят по 1 см^3 раствора сычужного фермента, хорошо перемешивают и ставят на 12 ч в термостат при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$. По истечении 12 ч пробы осматривают и относят молоко к одному из трех классов (табл. 9).

Таблица 9 - Оценка качества молока по сычужно-бродильной пробе

Класс	Оценка качества молока	Характеристика сгустка
I	Хорошее	Сгусток с гладкой поверхностью, упругий на ощупь, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке, которая не тянется и не горькая на вкус
II	Удовлетворительное	Сгусток мягкий на ощупь, с единичными глазками (1–10), разорван, но не вспучен
III	Плохое	Сгусток с многочисленными глазками, губчатый, мягкий на ощупь, вспучен, всплыл кверху или вместо сгустка образуется хлопьевидная масса

Для производства сыра не допускается сырое молоко III класса по редуцтазной пробе и III класса по сычужно-бродильной пробе.

Определение количества спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий

Готовят различные разведения сырого молока (или сыра), прогревают их при температуре $(75 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин и высевают по 1 см^3 каждого из разведений, как минимум, в две пробирки со средой СДА (среда для анаэробов). После застывания питательной среды ее поверхность заливают слоем водного агара высотой 15–20 мм. Посевы выдерживают в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение трех суток. Рост мезофильных анаэробных спорообразующих бактерий

в посевах определяют по образованию разрывов столбика агара и изменению цвета питательной среды с красного на соломенно-желтый. Образование в среде желтых пятен или точек также указывает на наличие лактатсбраживающих анаэробных бактерий.

Микробиологический анализ готового сыра

Отбор проб. Поверхность сыра в месте взятия пробы протирают ватой, смоченной этиловым спиртом, спирт зажигают. Стерильный шуп вводят наклонно в середину головки на $3/4$ его длины. Из столбика сыра на шупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г сыра и помещают в стерильную посуду с пробкой. Верхнюю часть столбика сыра на шупе возвращают на прежнее место, поверхность сыра заливают парафином или оплавливают нагретой металлической пластинкой.

Подготовка проб к анализу. Из взятого образца отвешивают 10 г на стерильном часовом стекле (чашке Петри, бюксе), переносят в стерильную или профламбированную ступку и тщательно растирают с небольшим количеством стерильной воды, добавляя стерильную воду, подогретую до 40–45 °С с таким расчетом, чтобы общий объем жидкости составил 90 см³. Содержимое ступки перемешивают и дополнительно растирают в течение 3–5 мин до получения тонкой суспензии. Суспензию (разведение сыра 10–1) переносят в колбу и закрывают стерильной пробкой. Из первого разведения готовят все последующие разведения, тщательно перемешивая суспензию. В сыре один раз в декаду после прессования, а также в процессе созревания определяют бродильный титр, количество маслянокислых бактерий и дрожжей. Для определения бродильного титра готовят разведения сыра от 10–1 до 10–4 и засевают их по 1 см³ в пробирки со средой Кесслера. Для определения количества маслянокислых бактерий засевают по 1 см³ первого, второго и третьего разведений сыра в пробирки с расплавленной средой СДА. После инкубации в течение 36–48 ч при температуре (30±1) °С подсчитывают количество выросших в пробирках колоний. Для определения количества дрожжей и плесеней делают посев по 1 см³ разведений сыра от 10–1 до 10–4 в чашки Петри с суслон-агаром. Бактерии группы кишечных палочек должны отсутствовать в 0,001 г доброкачественного сыра, содержание спор маслянокислых бактерий не должно превышать 100 в 1 г сыра.

Санитарно-микробиологическое исследование молочных консервов

Микробиологический контроль сгущенного молока с сахаром

Отбор пробы и подготовка к анализу. От каждой партии отби-

рают по две банки (одну банку до закатки, другую – после). Если продукт расфасован во фляги, то образцы отбирают из одной фляги от каждой партии. Банки со сгущенным молоком тщательно промывают щеткой в теплой воде и протирают. Перед вскрытием крышку банки тщательно фламбируют пламенем тампона из ваты, смоченного спиртом. Банки открывают стерильным консервным ножом. Отверстие банки немедленно закрывают стерильным пергаментом или стерильной крышкой чашки Петри. Из банки после перемешивания стерильной ложкой берут образец массой около 15 г и помещают в стерильную сухую колбу. Для анализа берут навеску массой 10 г, к которой добавляют 90 см³ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40–45⁰С, и взбалтывают в течение 3–5 мин. Из приготовленного таким образом первого разведения готовят все последующие.

Ход анализа. В сгущенном молоке с сахаром определяют:

- количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в 1 см³ продукта – посевом 10⁻¹–10⁻³ разведений на МПА;
- количество протеолитических бактерий – посевом 10⁻¹–10⁻² разведений на молочный агар;
- количество дрожжей и плесеней – посевом 1 см³ продукта и его первого разведения на сусло-агар;
- наличие бактерий группы кишечной палочки – посевом 1 см³ продукта и его первого разведения в пробирки со средой Кесслера.

Бактерии группы кишечной палочки должны отсутствовать в 1,0 г доброкачественного сгущенного молока с сахаром; КМАФАнМ не должно превышать 2·10⁴ КОЕ/г.

Микробиологический контроль сухих молочных продуктов

Отбор проб и подготовка к анализу. Из бочки или мешка стерильной ложкой берут из разных мест образец сухого молока массой около 50 г и помещают в стерильную сухую тару, плотно закрывающуюся пробкой или крышкой. Если продукт расфасован в банки или коробки, от каждой партии отбирают два образца в оригинальной упаковке. Из отобранного образца после тщательного перемешивания берут стерильной ложкой навеску массой 10 г и помещают в сухую стерильную колбу. К навеске добавляют 90 см³ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40–45⁰ С, и взбалтывают в течение 3–5 мин. Из полученного первого разведения готовят все последующие.

Ход анализа. В сухих молочных продуктах определяют: – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроор-

ганизмов (КМАФАнМ) в 1 см³ продукта – посевом 10⁻¹–10⁻³ его разведений на МПА; – количество протеолитических бактерий – посевом 10⁻¹–10⁻² разведений на молочный агар; – количество дрожжей и плесеней – посевом 1 см³ продукта и его первого разведения на сусло-агар; – наличие бактерий группы кишечной палочки – посевом 10⁻¹ и 10⁻² разведений продукта в пробирки со средой Кесслера. Бактерии группы кишечной палочки должны отсутствовать в 0,1 г доброкачественного сухого молока, КМАФАнМ не должно превышать 5·10⁴ КОЕ/г.

Исследование мороженого

С поверхности продукта стерильной ложечкой снимают навеску 50 г. От расфасованного мороженого берут из упаковки один, два образца. Навеску мороженого расплавляют в стерильной склянке при 40-45°С в течение 10-15 минут и из этой пробы готовят разведения в стерильной воде 40-45°С. Посевы делают на МПЛ - разведения 1:1000, 1:10000, 1:100000. Титр кишечной палочки устанавливают путем посева разведений 1:10, 1:100 на среду Кесслера.

Посевы в чашках Петри на МПЛ выращивают в течение 3 суток при 30°С в термостате, на среде Кесслера - при 43°С.

При посеве в три параллельные пробирки со средой Кесслера по 0,1 г мороженого наличие кишечной палочки допускается не более, чем в одной пробирке. В мороженом не должно содержаться патогенных и токсигенных микробов.

Контрольные вопросы

1. Отбор и подготовка для исследования проб сгущенного молока, сухого молока и мороженого.
2. Что представляют собой молочные консервы?
3. Какие микробиологические показатели определяют при контроле качества сгущенного молока?
4. Как контролируют производство сухих молочных консервов и мороженого?

ТЕМА 14

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА И МЯСОПРОДУКТОВ

Микробиологическое исследование свежего мяса

Микробиологическое исследование свежего мяса начинают микроскопического исследования мазков-отпечатков (бактериоскопический метод), а затем проводят бактериологический анализ.

Отбор проб. Для определения свежести мяса от каждой туши или полутуши отбирают для исследования три образца массой не менее 200 г каждый. Отбор производится целым куском из мышц бедра, лопатки и области 4–5 шейных позвонков. В образцах, кроме мышечной ткани, должны быть сухожилия и жир.

При бактериологическом исследовании на сибирскую язву направляют лимфатический узел, собирающий лимфу с места локализации пораженного очага, отечную ткань, а у свиней, кроме того, подчелюстной лимфатический узел.

Исследование на листериоз проводят на головном мозге, доле печени и почке.

При исследовании полутуши и четверти туши берутся кусок мышцы, лимфатические узлы и трубчатая кость.

Каждый образец упаковывают отдельно в пергаментную бумагу, где обозначаются дата и место взятия проб, а также вид животного, номер туши, причина и цель исследования. Затем образец отправляется в лабораторию.

Бактериоскопическое исследование

Бактериоскопический (микроскопический) метод – совокупность способов обнаружения и изучения морфологических и тинкториальных свойств бактерий (микробов) в лабораторных условиях. В лабораторной практике используют следующие типы микроскопических препаратов: препарат-отпечаток, висячую каплю, раздавленную каплю, тонкий мазок, фиксированный мазок.

Бактериоскопическое исследование мяса проводят в случае расхождения результатов между биохимическими и органолептическими методами оценки. Необходимость в бактериоскопическом исследовании свежести мяса отпадает в случае отрицательного результата при органолептическом анализе.

Из каждой пробы мяса необходимо приготовить не менее двух мазков-отпечатков.

Для приготовления мазка-отпечатка из поверхностного слоя (на

глубине 2–3 см) стерильными ножницами или скальпелем вырезают кусочек мяса массой 2–3 г, прикладывают его внутренней срезанной стороной к предварительно профламбированной поверхности предметного стекла.

Для приготовления мазков-отпечатков мяса из глубоких его слоев поверхность пробы необходимо сначала простерилизовать (смочить спиртом и обжечь на пламени или прижечь нагретым металлическим шпателем). Затем стерильным инструментом вырезать из глубины небольшие кусочки мяса размером 2×1,5×2,5 см и сделать мазки-отпечатки.

Приготовленные на предметных стеклах мазки-отпечатки необходимо высушить на воздухе, зафиксировать в пламени горелки или спиртовки и окрасить по методу Грама. Каждый мазок-отпечаток просмотреть под микроскопом с иммерсионным объективом не менее чем в 25 разных полях зрения.

При микрокопировании в каждом просмотренном поле зрения подсчитывают отдельно число клеток бактерий (кокков и палочек) и дрожжей, результатом является среднее значение общего количества клеток по двадцати пяти полям зрения. В поле зрения микроскопа отмечается также наличие или отсутствие следов распада мышечной ткани.

Результаты микрокопирования оценивают в соответствии с данными, представленными в табл. 10.

Таблица 10 - Оценка результатов бактериоскопического анализа мяса

Характеристика мяса	Микроскопическая картина
Свежее	Отсутствуют микробные клетки или видны единичные кокки и дрожжи (до 10 клеток); следов распада мышечной ткани нет
С частично измененной свежестью	Не более 30 кокков, дрожжей или палочковидных клеток; заметны следы распада мышечной ткани (ядра мышечных волокон в состоянии распада, исчерченность мышечных волокон слабо различима)
Несвежее	Более 30 микробных клеток с преобладанием палочковидных форм; наблюдается значительный распад мышечной ткани, почти полное исчезновение ядер и исчерченности мышечных волокон

Примечание. При обнаружении в мазках-отпечатках грамположительных палочек с обрубленными концами последние окрашивают 2 %-м раствором сафранина. Наличие в мазках, окрашенных сафранином, палочек или цепочек с капсулами свидетельствует о присутствии возбудителя сибирской язвы.

Бактериологическое исследование

Бактериологический метод заключается в выделении и идентификации чистой культуры возбудителя (популяции).

При отсутствии в мазках-отпечатках бактерий, сходных с сибирезвенными, из образцов мяса и субпродуктов проводят посевы на питательные среды для выявления в них возбудителей пищевых токсикоинфекций (бактерий родов *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*), возбудителей зооантропонозов (бацилл сибирской язвы, бактерий листериоза, рожи свиней и др.) и анаэробов (патогенных и токсикогенных клостридий).

При бактериологическом исследовании каждую пробу освобождают от жировой и соединительной тканей, погружают в спирт, затем стерильными ножницами из глубины различных мест вырезают кусочки мяса размером 2,0×1,5×2,5 см. После этого вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами. Для посева составляют пробы массой 15 г. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а другая – из кусочков паренхиматозных органов. Из каждой пробы в стерильной ступке готовят взвесь с содержанием в 1 см³ 0,5 г продукта.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ)

Общее количество микробов – это количество в 1 г продукта мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). Метод определения основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре 30 ± 1 °С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения. При исследовании свежего мяса в питательную среду засевают разведения от 10⁻¹ до 10⁻³.

Для посева 0,1 г продукта (разведение 10⁻¹) готовят первое десятикратное разведение взвеси: стерильной пипеткой набирают 1 см³ взвеси, переносят ее в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта (разведение 10⁻²) готовят второе десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с первым разведением, набирают 1 см³ первого разведения и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,01 г продукта).

Для посева 0,001 г продукта (разведение 10⁻³) готовят третье десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки со вторым разведением, набирают 1 см³ и переносят в

пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,001 г продукта).

В чашки Петри с заранее маркированной крышечкой засевают по 1 см³ каждого разведения и заливают 10–15 см³ расплавленным и остуженным до 40–45 °С мясопептонным агаром (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашек Петри путем легкого покачивания тщательно перемешивают для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят на 72 ч в термостат при температуре 30 °С.

По окончании культивирования подсчитывают количество выросших на чашках с МПА колоний. При этом для подсчета колоний пользуются лупой с увеличением в 4–10 раз или специальным прибором. При большом числе колоний и их равномерном распределении в агаре на дно чашки Петри наносят четыре или более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 см³ свежего мяса (X) вычисляют по формуле

$$X = n \cdot 10^m,$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;
 m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек с разными разведениями продукта.

Определение титра бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

В настоящее время к БГКП относят следующие роды из семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*.

БГКП представляют собой мелкие, неспорообразующие палочки, располагающиеся одиночно, по методу Грама красятся отрицательно, подвижные (за исключением бактерий рода *Klebsiella*), не образующие спор и капсул (кроме бактерий рода *Klebsiella*), факультативные анаэробы. Имеют гетероферментативную каталазу и цитохромы, могут получать энергию как в процессе дыхания, так и в процессе брожения. Осуществляют муравьино-кислое брожение с накоплением CO₂ и H₂O и кислот (уксусной, молочной, янтарной).

Метод определения БГКП помогает обнаружить образование газа или кислоты в элективной питательной среде, содержащей лактозу (среда Кесслера). Метод учета БГКП получил название бродильного метода, сущность которого заключается в посеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую питательную среду с последующим инкубированием при температуре 37 °С и обнаружении в поплавках газа с изменением цвета среды. При наличии газа на втором этапе исследования производят пересев материала из забродивших пробирок на среду Эндо. Для получения изолированной колонии пересев делается бактериальной петлей, густым штрихом. Чашки Петри с высевом инкубируются при температуре 27 °С в течение 24 ч, затем посевы просматриваются.

Если на среде Эндо не обнаружено характерных для БГКП ярких красных колоний с металлическим блеском или без него, то дают отрицательный ответ на это исследование. В таком случае анализ прекращают. При обнаружении на среде Эндо колоний определяется принадлежность выросших микроорганизмов к семейству кишечных бактерий. Для этого из колоний готовят фиксированный препарат и окрашивают его по методу Грама.

Обнаружение бактерий рода *Proteus*

Присутствие в свежем мясе в больших количествах бактерий рода *Proteus* свидетельствует о гнилостном разложении мясных белков. Биохимические свойства видов бактерий рода *Proteus* представлены в табл. 11. При микробиологическом контроле проводят суммарное определение всех видов бактерий рода *Proteus*.

Исследование проводится следующим образом: 0,5 см³ первого десятикратного разведения исследуемого мяса вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат и культивируют при температуре 37 °С в течение 18–24 ч.

В случае роста бактерий рода *Proteus* на скошенном МПА культура в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды.

Таблица 11 - Биохимические свойства бактерий рода *Proteus*

Вид микро-организма	Сбраживание углеводов					Разжиже-ние желати-на	Выде-ление серо-водо-рода	Образо-вание индола	Расщеп-ление мочевины
	Лак-тоза	Глю-коза	Ман-нит	Саха-роза	Ма-ль-тоза				
<i>P. vulgaris</i>	–	кг	–	кг	кг	+	+	+	+
<i>P. mirabilis</i>	–	кг	–	к	–	+	+	–	+
<i>P. rettgeri</i>	–	к	кг	к	–	–	–	+	+
<i>P. morganii</i>	–	кг	–	–	–	–	+	+	+

Примечание: кг – при сбраживании углеводов образуются кислота и газ; к – при сбраживании углеводов образуется кислота.

Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму, определяют подвижность. Присутствие граммотрицательных подвижных (Н-форм) мелких палочек указывает на наличие бактерий рода *Proteus*.

Выявление бактерий рода *Salmonella*

Пищевые отравления, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, занимают первое место среди микробных пищевых отравлений.

Навеску продукта объединенной пробы массой 25 г вносят во флакон, содержащий 100 см³ среды обогащения (Кауфмана, селенитовой или хлористо-магниевой «М»), и помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С. Через 16–24 ч делают посев из среды обогащения на среду Эндо, распределяя материал микробиологическим шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют в течение 20–24 ч при температуре 37 °С. На среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или слегка розовых прозрачных колоний. Из подозрительных колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму.

Выявление присутствия анаэробов

Берут 3–5 см³ приготовленной для посева взвеси (как описано выше), вносят в четыре пробирки со средой Кита–Тароцци, предварительно прогретой на кипящей водяной бане в течение 20–30 мин, затем охлаждают до 50 °С. Для выявления всех анаэробов две пробирки с посевами прогревают при 80 °С в течение 20 мин. При исследовании на *Cl. botulinum* типа Е одну пробирку подогревают в течение 15 мин

до температуры 60 °С (при этом сохраняются споры *Cl. botulinum* типа Е), а другую оставляют непрогретой.

Для выявления *Cl. botulinum* типа Е посевы выдерживают при температуре 30 °С, а для обнаружения других анаэробов – при температуре 37 °С. Термостатирование проводят в течение 5–10 сут, наблюдение за ростом культур – ежедневно.

Выявление возбудителей зооантропонозов

Зооантропонозы – это инфекционные болезни, поражающие людей и животных. Термин «зооантропонозы» происходит от греческих слов *zoon* – животное, *anthropos* – человек и *nosos* – болезнь. Заражение людей происходит при уходе за больными животными, при переработке больного скота, а также при употреблении в пищу необезвреженных пищевых продуктов. К зооантропонозным инфекциям относятся сибирская язва, бруцеллез, туберкулез, сеп, лептоспироз, рожа свиней, листериоз, Ку-лихорадка, орнитоз, ящур, туляремия.

Для выявления возбудителей зооантропонозов из верхней части надосадочной жидкости пастеровской пипеткой или бактериологической петлей на поверхность МПА в чашки Петри вносят 1–2 капли приготовленной взвеси и растирают по поверхности питательной среды шпатель (метод Дригальского).

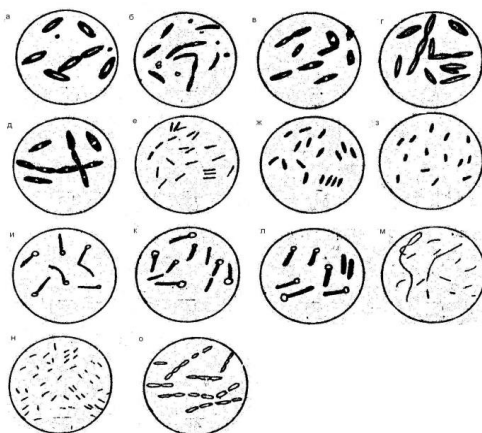


Рис. 41. Виды бактерий, вызывающих порчу мяса:

- а – *Bac. subtilis*; б – *Bac. mesentericus*; в – *Bac. megatherium*; г – *Bac. mycoides*;
 д – *Bac. cereus*; е – *Ps. fluorescens*; ж – *Ps. aeruginosa*; з – *Serratia marcescens*;
 и – *Cl. putrificum*; к – *Cl. sporogenes*; л – *Cl. perfringens*; м – *Proteus vulgaris*;
 н – *E. coli*; о – уксуснокислые бактерии

Микробиологическое исследование охлажденного, мороженого, соленого мяса и рассолов

Охлаждение, замораживание и посол – важные технологические операции, призванные сохранить качество мяса и мясопродуктов, придать им требуемые органолептические характеристики. На всех этапах этих технологических операций требуется проверка качества продукта при помощи микробиологического контроля.

Отбор проб. Для микробиологического исследования охлажденного и мороженого мяса отбираются образцы проб аналогично исследованию свежего мяса. Каждый из образцов соленого мяса имеет массу 400 г. Рассол отбирают в стерильные колбы вместимостью не менее 500 см³.

Порядок микробиологического исследования

Охлажденное мясо исследуют на общую микробную обсемененность, присутствие патогенных микроорганизмов, бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл, стафилококков, сульфитредуцирующих клостридий, бактерий рода *Proteus*. Методика исследования аналогична методике микробиологического исследования свежего мяса.

На поверхности охлажденного мяса обычно доминируют психрофильные микроорганизмы рода *Pseudomonas* и др. Они составляют около половины общего количества выявленных в мясе бактерий. Это мелкие, подвижные, не образующие спор и капсул грамотрицательные палочки. В охлажденном мясе могут содержаться патогенные микроорганизмы в количестве не более: сальмонеллы – в 25 г продукта, БГКП – в 0,1 г, бактерии рода *Proteus* – в 0,01 г.

В мороженом мясе имеется незначительное количество микроорганизмов, так как часть неспорообразующих бактерий погибает при низкой температуре (от –23 до –25 °С). В процессе хранения мороженого мяса при температуре выше –10 °С могут развиваться отдельные виды плесневых грибов родов *Cladosporium* и *Thamnidium* и некоторые виды дрожжей, которые вызывают порчу продукта. При температуре хранения около –5 °С могут развиваться плесневые грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*.

Контроль содержания в мясе плесневых грибов и дрожжей проводится по общепринятым методикам, изученным в курсе общей микробиологии.

Качественный рассол содержит большое количество различных микроорганизмов. В процессе посола изменяется количественный и качественный состав микрофлоры рассола и мясопродуктов. В результате размножения микробов, приспособленных к условиям посола, общее количество микроорганизмов в рассоле в конце посола возрастает в десятки раз.

В соленом мясе (солонине) могут развиваться солеустойчивые (или

галофильные) микроорганизмы. Обычно хлорид натрия действует на многие бактерии как консервант. При 12–15 %-й концентрации поваренной соли в среде размножаются галофилы, которые могут вызывать порчу продукта. Галофилами являются многие виды плесеней, некоторые дрожжи, многие пигментообразующие палочковидные бактерии.

Солеустойчивые микроорганизмы способны расти в средах с концентрацией соли 6–8 % и сохранять жизнеспособность в средах с высоким содержанием соли: 20 % и более.

В доброкачественной солонине и рассолах преобладают солеустойчивые молочнокислые бактерии, микрококки и некоторые виды грамотрицательных бактерий.

В доброкачественном рассоле БГКП не должны содержаться более чем в 50 мл, в заливочных рассолах после прогревания при 100 °С в течение 5 мин БГКП не должны содержаться в 500 мл, а споры анаэробных клостридий и аэробных бацилл – в 50 мл.

Определение влияния факторов внешней среды на микроорганизмы

Определение влияния на бактерии концентрации поваренной соли. В четыре пробирки со средой МПБ, содержащей 10, 15, 20 % NaCl и без него (контроль), прокаленной бактериологической иглой вносят по кусочку соленого мяса величиной со спичечную головку. Пробирки надписывают и помещают на 24–48 ч в термостат с температурой 25–30 °С.

По окончании термостатирования анализируют посеvy (изменения, произошедшие с питательной средой, форму клеток и наличие спор). Степень мутности среды оценивают, пользуясь условными обозначениями: – отсутствие роста; + слабый рост; ++ умеренный рост; +++ обильный рост. Для идентификации выросших бактерий готовят фиксированный препарат. Окрашивают его метиленовой синью и микроскопируют.

Контрольные вопросы

1. Какие методы определения доброкачественности мяса относятся к микробиологическим?
2. В каком случае проводят бактериоскопический анализ мяса и мясопродуктов?
3. В чем заключается бактериологический анализ мяса?
4. По каким микробиологическим показателям оценивают доброкачественность охлажденного, мороженого и соленого мяса?
5. Какие микроорганизмы развиваются в охлажденном, а какие в соленом мясе?

ТЕМА 15

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ И МЯСНЫХ КОНСЕРВОВ

Микробиологическое исследование колбасных изделий

Микробиологическое исследование колбасных изделий проводят при нарушении санитарного и технологического режимов производства или использовании сырья пониженного качества, несоответствии органолептических показателей продукции требованиям стандарта или технических условий, а также периодически для проверки соблюдения санитарного и технологического режимов производства продуктов.

Периодические исследования по предупредительному контролю соблюдения санитарного и технологического режимов колбасного производства проводят в следующие сроки:

- для колбас фаршированных, ливерных, кровяных высшего, I и II сортов, зельцев высшего, I и II сортов — не реже 1 раза в 15 дней;
- для колбас вареных высшего, I и II сортов, мясных хлебов, сосисок, сарделек — не реже 1 раза в 15 дней;
- для колбас ливерных и кровяных III сорта, зельцев III сорта, студней и паштетов — не реже 1 раза в 5 дней;
- для колбас полукопченых, варено-копченых и сырокопченых — не реже 1 раза в месяц;
- для продуктов из свинины, говядины, баранины, мяса птицы и других видов убойных животных: вареных, запеченных, жареных — не реже 1 раза в 15 дней; копчено-вареных, копчено-запеченных, сырокопченых — не реже 1 раза в месяц.

Определение общего количества микробов; выделение сальмонелл, эшерихий, протей, стафилококков и сульфитредуцирующих анаэробов. Пробы для бактериологического исследования отбирают согласно ГОСТ 9792—73 от каждой партии (одного вида, сорта, наименования, выработанных в одной смене и др.). На пробы выписывают направление установленной формы, пробы хранят при температуре 4-6⁰ С не более 4 ч с момента отбора.

Для бактериологического исследования колбасных изделий отбирают образцы длиной не менее 15 см; продуктов из говядины, баранины, свинины вареных, запеченных, жареных, сырокопченых — длиной не менее 10 см; сосисок, сарделек — целыми единицами. Пробу продуктов без оболочки (хлеб) составляют из проб, отобранных из трех образцов. Пробу упаковывают в пергаментную бумагу, указывают сорт, вид изделия и помещают в водонепроницаемую тару. Вместе с

пробами направляют акт отбора, в котором указывают наименование и время изготовления продуктов, цель исследования.

В зависимости от вида продукта объединенную пробу массой 50 г составляют следующим образом. Колбасные изделия в оболочке и продукты из свинины, баранины и говядины помещают в эмалированный тазик, протирают тампоном, смоченным спиртом, и обжигают над пламенем. Батоны разрезают стерильным скальпелем на две половины, не рассекая оболочки противоположной стороны батона. Пробу отбирают из нескольких участков центральной части и из-под оболочки обеих половин батона. Для посева берут стерильным инструментом кусочки фарша, которые помещают в предварительно взвешенную бюксу, и отвешивают на весах навеску массой 20 г (с погрешностью, не превышающей 0,1 г).

Навеску помещают в стерильную ступку и тщательно растирают стерильным пестиком, постепенно приливая 80 см³ стерильного физ. раствора с расчетом разведения материала в соотношении 1:10. После отстаивания при комнатной температуре в течение 15 мин 1 см³ приготовленной испытуемой взвеси высевают на питательные среды.

Бактериологическое исследование колбасных изделий включает определение общего количества микробов в 1 г продукта (этот метод не распространяется на сырокопченые колбасы), выявление бактерий родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, коагулазоположительных стафилококков и сульфитредуцирующих анаэробов. При оценке вареных и сырокопченых колбас, сосисок, сарделек и мясных хлебов по микробиологическим показателям необходимо руководствоваться следующими нормативами: наличие бактерий группы кишечных палочек (лактозосбраживающие) в 1 г, наличие сальмонелл в 25 г; наличие сульфитредуцирующих клостридий в 0,01 г продукта не допускается.

Определение общего количества микробов в 1 г продукта выполняют следующим образом. Из каждой пробы делают не менее двух посевов, чтобы на чашках Петри с МПА выросло от 30 до 300 колоний. На одну чашку Петри высевают 0,1 г, а на другую — 0,01 г продукта. Для посева 0,1 г продукта готовят первое десятикратное разведение взвеси, стерильной пипеткой набирают 5 см³ взвеси, переносят ее в пробирку с 5 см³ стерильного физиологического раствора или пептонной воды (1 см³ полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта готовят следующие разведения. Стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки, набирают 1 см³ и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ испытуемого раствора вторичного разведения содержит 0,01 г продукта).

Из приготовленных разведений вносят по 1 см³ раствора в стерильные чашки Петри и заливают 12...15 см³ расплавленного, охлажденного до 45-46 °С МПА, быстро смешивают с питательным агаром, осторожно вращая чашки по поверхности стола. После застывания агара его поверхность заливают слоем 2-3 мм голодного агара для предотвращения развития на поверхности протей. Чашки Петри переворачивают и помещают в термостат для культивирования микробов при 30 °С на 72 ч.

Для выявления бактерий рода *Salmonella* навеску продукта массой 25 г объединенной пробы вносят во флакон, содержащий 100 см³ среды обогащения (Кауфмана, селенитовой или хлористомagneзиевой “М”), и помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С. Через 16...24 ч делают посев из среды обогащения на среду Эндо, распределяя материал шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют при температуре 37 °С в течение 20...24 ч.

Для выявления бактерий группы кишечных палочек в среду Кесслера или хинозолбромкрезолпурпурную “ХБ” вносят 5 см³ испытуемой взвеси, помещают в термостат при 37 °С на 18...20 ч. При росте бактерий группы кишечных палочек на среде Кесслер в поплавке образуется газ, а среда “ХБ” приобретает желтый цвет.

Для приготовления среды “ХБ” в 1 см³ водопроводной воды растворяют 10 г пептона, 5 г хлорида натрия и 5 г маннита, кипятят 15...20 мин, устанавливают рН 7,4...7,6, фильтруют, вновь кипятят 10 мин и охлаждают до 60 °С. Добавляют стерильно 30 см³ дрожжевого автолизата, 15 см³ желчи крупного рогатого скота, 10 см³ раствора хинозола (1 100) и 10 см³ 1,6%-ного раствора спиртового бромкрезолового пурпурного. Среду разливают в пробирки по 7...8 см³. Цвет готовой среды — фиолетовый.

Для выявления бактерий рода *Proteus* в Н-форме 0,5 см³ анализируемой взвеси вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат при 37 °С и культивируют в течение 18...24 ч.

Выявление коагулазоположительных стафилококков: из взвеси (1:10) проводят посев по методу Дригальского на желчно-солевой агар (ЖСА), содержащий 6,5 % NaCl для выявления лецитиназной активности. Посевы термостатируют при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Выявление сульфитредуцирующих клостридий: в пробирки, содержащие 9 см³ расплавленной и охлажденной до 45 °С среды Вильсон—Блера, вносят по 1 см³ десятикратных разведений (от 10⁻¹ до 10⁻⁷)

взвеси исследуемого продукта. Тщательно перемешивают посевной материал, помещают в термостат и культивируют при 46 °С в течение 8...12 ч или при 37 °С в течение 20 ч. Появление в среде черных колоний или почернение среды свидетельствует о присутствии сульфитредуцирующих клостридий.

Для определения общего количества микробов в 1 г колбасных изделий подсчитанное количество колоний на чашках Петри с МПА умножают на степень разведения анализируемого продукта. За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек разной массы продукта.

Для определения бактерий группы кишечных палочек при обнаружении желтого цвета на среде “ХБ” или газа в поплавке на среде Кесслер проводят высеv на чашки Петри со средой Эндо или Левина и помещают в термостат при 37 °С на 18...20 ч. Дальнейшее исследование ведут по методике бактериологического исследования мяса.

Выявление сальмонелл: на среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или слегка розовых прозрачных колоний. Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму. В случае отсутствия роста на элективных средах и при наличии роста на средах обогащения посеvы пересевают из сред Кауфмана, Киллиана и других в чашки Петри со средой Эндо или Левина и термостатируют при 37 °С в течение 24 ч. В дальнейшем исследование проводят по методике бактериологического исследования мяса.

Выявление протей: на скошенном МПА культура поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком. Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму, определяют подвижность. Обнаружение грамтрицательных подвижных (H-форм) мелких палочек указывает на наличие бактерий рода протей.

Выявление коагулазоположительных стафилококков: на ЖСА колонии токсигенных стафилококков образуют “радужный венчик”. Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму. Для подтверждения патогенности стафилококков ставят реакцию плазмокоагуляции. Наличие грамположительных стафилококков, давших положительную реакцию плазмокоагуляции и реакцию на лецитиназу, свидетельствует о присутствии токсигенных стафилококков.

Определение сульфитвосстановителей (*C1. perfringens*, *C1. sporogenes*): при росте клостридий сульфитвосстановителей на среде Вильсон—Блера, на которой в результате восстановления сульфата натрия в сульфит натрия происходит взаимодействие с хлоридом железа, среда чернеет за счет образования сульфита железа. За положитель-

ный титр клостридий принимают то максимальное разведение взвеси, в посеве которой произошло почернение среды. Например, если характерные изменения наблюдаются в пробирках с разведением 10^{-2} , то считают, что в 1 г исследуемого продукта 10^2 микробных клеток.

Микробиологическое исследование консервов

Микробиологическое исследование консервов до стерилизации

Контроль выполняется в соответствии с инструкцией “О порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых базах, в розничной торговле и на предприятиях общественного питания” (1973).

Бактериальную обсемененность содержимого консервных банок перед стерилизацией проверяют немедленно после закатки банок.

Для микробиологического исследования консервов до стерилизации отбирают три образца (банки) сразу после закатки.

В лаборатории банки тщательно моют теплой водой и вытирают. Крышку банки, смоченную спиртом, фламбируют. Банки открывают стерильным пробойником.

Пробы для анализа содержимого банок отбирают в зависимости от вида и консистенции продукта. Если консервы содержат большое количество заливки или бульона, то для посева берут непосредственно жидкую часть продукта. Если в консервах отсутствует жидкая фаза или имеется в незначительном количестве, то в продукт добавляют стерильную воду в соотношении 1:1 и высевают смыв с продукта без разбавления или из последовательно приготовленных разведений. При фасовании в тару вместимостью до 0,5 л содержимое банки перекладывают в стерильную банку (вместимостью 1,5...2 л) с таким же содержанием воды, закрывают крышкой и встряхивают в течение 3 мин, после чего отбирают пробу для посева. В зависимости от предполагаемого микробного обсеменения сырья пробу разводят с таким расчетом, чтобы в чашке с питательной средой выросло не более 300 колоний.

Микробиологические исследования банок перед стерилизацией включают определение общего количества микроорганизмов в содержимом банок, выявление спор облигатных анаэробов и термофильных бактерий (возбудителей плоскокислой порчи проводится только для консервов, содержащих неокисленные продукты — зеленый горошек, фасоль, кукурузу).

Общее количество микроорганизмов определяют ежедневно один раз в каждую смену на каждой линии и по каждому виду вырабатываемой продукции.

В каждом образце до стерилизации этот показатель не должен превышать в 1 г продукта следующих значений: 200 тыс. микробных клеток в мясе тушеном, 20 тыс. микробных клеток в мясо-растительных и сало-бобовых консервах при закладке мяса и фарша с предварительной тепловой обработкой, 50 тыс. микробных клеток в мясо-растительных консервах при закладке сырого мяса и фарша, 10 тыс. микробных клеток в мясном и печеночном паштете.

Для определения общего количества микробов в исследуемой пробе консервов делают посев 1 см³ (г) продукта или его разведении в чашки Петри с МПА. Через сутки культивирования посевов при температуре 37 °С подсчитывают число выросших колоний и определяют общую микробную обсемененность по формулам:

при посеве непосредственно продукта

$$X = a : q \quad (2)$$

при посеве смыва продукта

$$X = (a \cdot 10^n \cdot V_{\text{вод}}) : (V_{\text{прод.}} \cdot q) \quad (3)$$

где x — количество микробов в 1 см (г) продукта, a — число колоний, выросших на чашке, n — степень разведения продукта, $V_{\text{вод}}$ — объем воды в банке, см³, $V_{\text{прод.}}$ — объем продукта в банке, см³, q — объем посевного материала, внесенного в чашку, см³.

Наличие спор облигатных анаэробов в содержимом консервных банок до стерилизации выявляют с профилактической целью 1...2 раза в неделю по каждому виду вырабатываемой продукции; немедленно (на следующий день) — после установления повышенной бактериальной обсемененности консервируемого продукта до стерилизации.

При удовлетворительном санитарном состоянии технологических линий в содержимом консервных банок до стерилизации не должны обнаруживаться споры облигатных анаэробов.

Для выявления анаэробов из подготовленного для анализа образца стерильной трубкой или пипеткой отбирают примерно 10 см³ продукта, вносят в стерильную пробирку и ставят на кипящую водяную баню на 20 мин до достижения внутри пробирки 94...96 °С. После охлаждения 0,5 см³ прогретого продукта засевают в пробирку с накопительной средой Китта—Тароцци. Посевы термостатируют при температуре 37 °С, спустя 48 ч после посева в среде отмечают газообразование и анаэробный рост. При наличии анаэробного роста из накопительных посевов 1...2 капли высевают в чашки Петри. Чашку Петри

заливают 30 см³ расплавленного МПА с 1 % глюкозы. Сразу же после застывания агара на его поверхность пинцетом кладут стерильное предметное стекло так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха. Затем чашку переворачивают крышкой вниз и ставят в термостат при температуре 37 °С.

Облигатные анаэробы выявляются на чашке под стеклом в центральной части в виде отдельных колоний или сплошного роста на расстоянии 3...4 мм от края стекла, образуя иногда под стеклом пузырьки газа. Факультативные анаэробы растут не только под стеклом, но и на всей поверхности среды в чашке.

Споры термофильных бактерий выявляют следующим образом: из предварительно прогретой пробы отбирают 5 см³ взвеси и вносят в 25 см³ МПА с 1 % глюкозы и 0,004 % бромкрезол-пурпура (среда должна иметь слабо-фиолетовую окраску). Посевы помещают в термостат при температуре 55 °С на 24...48 ч. Изменение окраски среды от фиолетовой до желтой или появление желтых ореолов вокруг колоний свидетельствует о наличии в исследуемой пробе термофильных бактерий.

Возбудителями плоскокислой порчи являются термофильные спорообразующие аэробные микроорганизмы: *Vac. stearothermophilus*, *Vac. aerothermophilus*, *Vac. coagulans* и др.

Vac. stearothermophilus — спорообразующая подвижная палочка, грамположительна, капсул не образует. Споры располагаются терминально.

Vac. aerothermophilus — крупная подвижная спорообразующая палочка, грамположительна, капсул не образует. Споры располагаются субтерминально.

Vac. coagulans — крупная подвижная палочка, образует споры, которые располагаются центрально или терминально, грамположительна.

Термофильные микроорганизмы, размножаясь в продукте в условиях хранения при повышенных температурах (40...70 °С), могут разлагать углеводы с образованием органических кислот без выделения газа. Они не вызывают бомбажа банок, но продукт приобретает кислый запах и неприятный кислый вкус.

Микробиологическое исследование консервов после стерилизации

Готовые консервы после стерилизации подвергают бактериологическому исследованию в следующих случаях:

- обнаружение в партии повышенной микробной обсемененности или наличие спор облигатных анаэробов в содержимом банок перед стерилизацией;

- отступление от технологических инструкций при изготовлении

данной партии продукта;

- закладка консервов на длительное хранение;
- изготовление консервов на экспорт;
- отсутствие показателя допустимой бактериальной обсемененности консервов до стерилизации.

Для бактериологического исследования готовой продукции согласно ГОСТ 87560—70 отбирают среднюю пробу от сменной выработки консервов одного наименования и одного размера тары. При фасовании консервов в жестяную или стеклянную тару вместимостью до 1 л отбирают две банки, которые завертывают в бумагу, опечатывают или пломбируют. Пробы сопровождают актом изъятия проб и этикеткой, на которой указывают наименование предприятия, выработавшего продукт, наименование, сорт и дату выработки продукта, дату отбора пробы, номер ГОСТа или технических условий на данный продукт.

В лаборатории образцы консервов осматривают — банки должны быть без дефектов (бомбаж, следы подтеков и т.д.). Их тщательно моют, вытирают полотенцем и проверяют на герметичность в сосудах с горячей водой либо в аппарате Бомбаго или Жадана. Для микробиологического исследования отбирают только герметичные банки. Отобранные консервы подвергают термостатной выдержке.

Для выявления жизнедеятельности мезофильных факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов мясные и мясорастительные консервы, сосиски, ветчину, а также другие консервы с $pH > 4,4$ термостатируют при температуре $37 \pm 0,5$ °С.

Консервы в таре вместимостью 1 л и менее выдерживают в термостате в течение 5 сут, консервы вместимостью более 1л— 10 сут.

Для установления стерильности или выявления жизнедеятельности термофильных аэробных, факультативно-анаэробных и термофильно-анаэробных микроорганизмов овоще-мясные консервы для детского и диетического питания и другие консервы в таре любой вместимости термостатируют в течение 3 сут при $55 \pm 0,5$ °С. После термостатирования консервы выдерживают в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего отмечают наличие дефектов тары.

Наряду с термостатной выдержкой из консервов, отобранных для анализа, делают высевы на питательные среды, чтобы установить характер остаточной микрофлоры.

Банки вскрывают в специально приспособленном для проведения стерильных работ боксе. Ватным тампоном, смоченным спиртом, протирают крышку банки и фламбируют. После обжигания острием пробойника прокалывают отверстие в крышке банки. Отверстие должно иметь 1...1,5 см в диаметре. После вскрытия банки пробойник уби-

рают и тотчас же высевают содержимое банки на питательные среды. Материал из банки берут стерильной стеклянной трубкой с внутренним диаметром 0,8 см (непосредственно перед высевом одну из трубок в пенале проверяют на стерильность). Посев проводят в асептических условиях. В каждой пробе должно быть немного жидкости (бульона) и плотных кусочков продукта (мяса, фарша и т.д.).

Для выявления мезофильных аэробных микроорганизмов из каждой банки по 2 см³ высевают в две пробирки МПБ с глюкозой. Посевы инкубируют в термостате с температурой 37 °С в течение 5 сут с ежедневным просмотром.

Для выявления анаэробов посев проводят в две пробирки со средой Китта—Тароцци. Перед посевом для удаления растворенного кислорода среду регенерируют нагреванием, затем стеклянной трубкой в каждую пробирку вносят 2 см³ содержимого банки, засеянные пробирки выдерживают при температуре 37 °С в течение 5 сут, ежедневно контролируя рост культур.

Для выявления возбудителей ботулизма пробу консервированного продукта не менее 30 см³ или пробу жидкости 2 см³ высевают в четыре флакона с регенерированной средой Китта—Тароцци. При этом проводят обработку посевов. Первый флакон прогревают при 80 °С в течение 30 мин, второй оставляют без прогрева и термостатируют при 37 °С. Третий флакон с посевом прогревают при 60 °С в течение 15 мин, а четвертый не прогревают. Посевы термостатируют при температуре 30 °С. За посевами наблюдают в течение 10 сут.

Для выявления коагулазоположительных стафилококков проводят посев на желточно-солевой агар. Методы посева и обнаружения коагулазоположительных стафилококков, а также сульфит-редуцирующих клостридий описаны в лабораторной работе “Микробиологическое исследование колбасных изделий”.

Учет результатов бактериологического исследования консервов. Для выявления мезофильных аэробных микробов при появлении признаков роста аэробных микроорганизмов (помутнение МПБ, образование пристеночного кольца или пленки и осадка) готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют.

Если в мазках обнаруживают крупные грамположительные палочки или кокки, проводят высеv на МПА. Выросшие затем на МПА микробные колонии изучают в дальнейшем для идентификации микроорганизмов.

При выявлении в мазках мелких грамтрицательных неспорообразующих палочек из посевов делают высевы на среду Эндо, скошенный агар по Шукевичу и на МПА с 1 % глюкозы; ставят каталазную пробу.

Мезофильные анаэробные микробы вызывают помутнение среды с выделением газа, в результате чего появляется посторонний запах, иногда разлагаются кусочки печени. При наличии роста микробов материал берут пастеровской пипеткой, готовят мазки и окрашивают по Граму. В мазках, содержащих облигатно-анаэробные бактерии, обнаруживают грамположительные спорообразующие палочки.

Для подтверждения принадлежности выявленных спорообразующих микроорганизмов к мезофильным облигатным анаэробам рода *Clostridium* проверяют отсутствие у них каталазы. Если каталаза не выявлена, то считают, что в посевах присутствуют мезофильные облигатно-анаэробные микробы рода *Clostridium*.

При обнаружении признаков роста микроорганизмов на среде Китта—Тароцци посевы выдерживают в термостате 6 сут, периодически отбирая из флаконов культуральную жидкость для анализа. Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму. При наличии в среде возбудителя ботулизма отмечают помутнение среды, газообразование, маслянокислый запах. В мазках, окрашенных по Граму, обнаруживают грамположительные крупные палочки со спорами в виде ракеток. Если в консервированном продукте возбудитель находится в вегетативной форме, то видимый рост микроорганизмов можно наблюдать в непрогретых флаконах. Культуральную жидкость исследуют на наличие токсина и устанавливают его тип.

Токсигенные свойства культуры определяют путем постановки биопробы на белых мышках. Гибель мышей, получивших один фильтр 7-дневной культуры, и выживание контрольной группы животных, которым вводили смесь фильтрата с антиботуллиническими сыворотками, свидетельствуют о наличии в испытуемой культуре ботуллинического токсина. Тип токсина устанавливают по реакции нейтрализации с типоспецифическими сыворотками (А, В, С, Е).

В случае выявления *Cl. botulinum* данная партия консервов считается непригодной в пищу, на что выдается заключение санитарно-эпидемиологической службы с предписанием об уничтожении. При выявлении клостридий других видов вопрос об использовании данной партии консервов решают местные органы санитарно-эпидемиологической службы.

Контрольные вопросы

1. В каких случаях проводят бактериологическое исследование колбасных изделий?
2. Какова методика отбора проб колбас для бактериологического исследования?

3. Как исследуют колбасы для выявления бактерий группы кишечных палочек, сальмонелл, протей, стафилококков, клостридий (сульфидредуцирующих)?

4. Каковы правила отбора и подготовки образцов консервов для бактериологического исследования?

5. С какой целью проводят бактериологическое исследование консервов до стерилизации?

6. Каковы цель и методика бактериологического исследования консервов после стерилизации?

ТЕМА 16 САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЯИЦ

Санитарно-микробиологическое исследование яиц и яйцепродуктов

Нередко птицы являются скрытыми носителями инфекционных болезней, несут яйца, содержащие вирусы, бактерии, плесневые грибы, возбудителей сальмонеллеза и туберкулеза. Особую опасность представляют яйца водоплавающей птицы.

Яйца – скоропортящийся продукт, их необходимо хранить в условиях, которые обеспечивали бы замедленное протекание в них физико-химических и микробиологических процессов.

Скорлупа защищает яйца от проникновения микроорганизмов. Составляющие элементы яйца обладают разной степенью устойчивости к микробам. Наиболее устойчив к разложению и обсеменению белок, что объясняется содержанием в нем бактерицидных веществ: лизоцима, овидина, кональбумина, овомукоида, овомуцина и углекислоты.

Для производства меланжа используют яйца, отвечающие требованиям действующих нормативных документов. Нельзя использовать утиные, гусиные и известкованные куриные яйца, а также яйца, поступающие от инфицированных птиц.

Санитарно-микробиологическое исследование яиц и яичных продуктов проводят при контроле птицефабрик и пищевых производств. На каждую партию яиц и яйцепродуктов предприятием-изготовителем выдается санитарно-ветеринарное заключение об их безопасности и качестве.

Микробиологическое исследование яиц и яйцепродуктов, поступающих на мясное производство, проводят в тех случаях, когда при овоскопии возникает сомнение в их качестве, а также при наличии

эпизоотических показателей (поступлении яиц из хозяйств, неблагополучных по сальмонеллезу и другим инфекционным болезням).

Отбор проб. Перед исследованием яйца протирают стерильным тампоном, а затем обжигают горящим ватным тампоном, смоченным спиртом. Затем вскрывают яйцо, пробивая скорлупу профламбированным инструментом (пинцетом или скальпелем), и отбирают содержимое градуированной стерильной пипеткой в необходимом для посевов количестве (раздельно белок и желток).

При контроле яичного порошка от каждой партии отбирают и вскрывают 10 единиц упаковки (при малом количестве не менее трех единиц). От каждой вскрытой единицы упаковки отбирают одинаковое количество яичного порошка и составляют среднюю пробу с таким расчетом, чтобы общая масса ее была около 250 г. Отобранную среднюю пробу тщательно перемешивают, помещают в стерильную сухую банку и плотно закрывают пробкой.

Для микробиологического исследования меланжа от каждой партии отбирают 3 % банок. С соблюдением правил асептики из каждой взятой для исследования банки отбирают по 50 г продукта. Пробы из разных банок помещают в общую стерильную посуду, тщательно перемешивают и из этой смеси отбирают для анализа среднюю пробу меланжа массой 50–55 г.

Яичный меланж перед исследованием размораживают в воде при температуре 45 °С. После размораживания яичную массу осторожно перемешивают стеклянной палочкой в течение 3 мин, не допуская пенообразования. Для исследования отбирают пробу градуированной стерильной пипеткой в необходимом для посевов количестве.

Бактериологическое исследование. Бактериологическое исследование яиц и яйцепродуктов включает в себя определение КМАФАнМ, титра БГКП, выявление сальмонелл, протей, микроскопических грибов.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ), титра БГКП, выявление бактерий рода *Salmonella* и *Proteus* проводятся по методике.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ)

Общее количество микробов – это количество в 1 г продукта мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). Метод определения основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре 30 ± 1 °С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом

наиболее вероятного микробного обсеменения. При исследовании яиц в питательную среду засевают разведения от 10^{-1} до 10^{-3} .

Для посева 0,1 г продукта (разведение 10^{-1}) готовят первое десятикратное разведение взвеси: стерильной пипеткой набирают 1 см³ взвеси, переносят ее в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта (разведение 10^{-2}) готовят второе десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с первым разведением, набирают 1 см³ первого разведения и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,01 г продукта).

Для посева 0,001 г продукта (разведение 10^{-3}) готовят третье десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки со вторым разведением, набирают 1 см³ и переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора (1 см³ полученного раствора содержит 0,001 г продукта).

В чашки Петри с заранее маркированной крышечкой засевают по 1 см³ каждого разведения и заливают 10–15 см³ расплавленным и остуженным до 40–45 °С мясопептонным агаром (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашек Петри путем легкого покачивания тщательно перемешивают для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышечками вниз и ставят на 72 ч в термостат при температуре 30 °С.

По окончании культивирования подсчитывают количество выросших на чашках с МПА колоний. При этом для подсчета колоний пользуются лупой с увеличением в 4–10 раз или специальным прибором. При большом числе колоний и их равномерном распределении в агаре на дно чашки Петри наносят четыре или более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 см³ свежего мяса (X) вычисляют по формуле:

$$X = n \cdot 10^m, (4)$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;
 m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек с разными разведениями продукта.

Определение титра бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

В настоящее время к БГКП относят следующие роды из семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*.

БГКП представляют собой мелкие, неспорообразующие палочки, располагающиеся одиночно, по методу Грама красятся отрицательно, подвижные (за исключением бактерий рода *Klebsiella*), не образующие спор и капсул (кроме бактерий рода *Klebsiella*), факультативные анаэробы. Имеют гетероферментативную каталазу и цитохромы, могут получать энергию как в процессе дыхания, так и в процессе брожения. Осуществляют муравьино-кислое брожение с накоплением CO_2 и H_2O и кислот (уксусной, молочной, янтарной).

Метод определения БГКП помогает обнаружить образование газа или кислоты в элективной питательной среде, содержащей лактозу (среда Кесслера). Метод учета БГКП получил название бродильного метода, сущность которого заключается в посеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую питательную среду с последующим инкубированием при температуре 37 °С и обнаружении в поплавках газа с изменением цвета среды. При наличии газа на втором этапе исследования производят пересев материала из забродивших пробирок на среду Эндо. Для получения изолированной колонии пересев делается бактериальной петлей, густым штрихом. Чашки Петри с высевом инкубируются при температуре 27 °С в течение 24 ч, затем посеvy просматриваются.

Если на среде Эндо не обнаружено характерных для БГКП ярко-красных колоний с металлическим блеском или без него, то дают отрицательный ответ на это исследование. В таком случае анализ прекращают. При обнаружении на среде Эндо колоний определяется принадлежность выросших микроорганизмов к семейству кишечных бактерий. Для этого из колоний готовят фиксированный препарат и окрашивают его по методу Грама.

Обнаружение бактерий рода *Proteus*

Присутствие в свежем мясе в больших количествах бактерий рода *Proteus* свидетельствует о гнилостном разложении мясных белков. Биохимические свойства видов бактерий рода *Proteus* представлены в табл. 10. При микробиологическом контроле проводят суммарное определение всех видов бактерий рода *Proteus*.

Исследование проводится следующим образом: 0,5 см³ первого десятикратного разведения исследуемого мяса вносят в конденсацион-

ную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат и культивируют при температуре 37 °С в течение 18–24 ч.

В случае роста бактерий рода *Proteus* на скошенном МПА культура в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды.

Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму, определяют подвижность. Присутствие грамотрицательных подвижных (Н-форм) мелких палочек указывает на наличие бактерий рода *Proteus*.

Выявление бактерий рода *Salmonella*

Пищевые отравления, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, занимают первое место среди микробных пищевых отравлений.

Навеску продукта объединенной пробы массой 25 г вносят во флакон, содержащий 100 см³ среды обогащения (Кауфмана, селенитовой или хлористо-магниевой «М»), и помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С. Через 16–24 ч делают посев из среды обогащения на среду Эндо, распределяя материал микробиологическим шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют в течение 20–24 ч при температуре 37 °С. На среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или слегка розовых прозрачных колоний. Из подозрительных колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму.

Определение количества микроскопических грибов

Высевают в чашки Петри по 1 см³ из каждого приготовленного разведения и затем заливают расплавленным, охлажденным до температуры 45 °С суловым агаром или средой Сабуро. Посевы культивируют в течение четырех суток при температуре 25 °С. В целях более точного учета количества плесневых грибов из выросших на питательной среде колоний, типичных для плесневых грибов по внешнему виду, выборочно готовят препарат «раздавленная капля» и изучают его под объективами сухой системы микроскопа.

Контрольные вопросы

1. Чем обусловлена стойкость белка яйца к различным микробам?
2. Что включает в себя бактериологическое исследование яиц и яйцепродуктов?

ТЕМА 17

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ

Санитарно-микробиологическое исследование рыбы-сырца

Мышечный сок и мышечная ткань свежельовленной здоровой рыбы считаются стерильными. Значительные количества бактерий обнаруживаются в покровной слизистой оболочке, на наружных жабрах и в желудочно-кишечном тракте.

Степень обсеменения рыбы бактериями зависит от окружающей среды и способа ее вылова.

В свежельовленной рыбе 60 % от всей микрофлоры составляют бактерии рода *Achromobacter*, остальные представители микрофлоры представлены бактериями родов *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* и *Corynebacterium*.

Довольно часто пресные водоемы загрязняются сточными водами, поэтому пресноводные рыбы могут являться носителями патогенных для человека бактерий – сальмонелл, стафилококков и листерий.

Доброкачественность рыбы и рыбных продуктов определяют органолептическим, биохимическим и микробиологическим методами. К микробиологическим также относятся бактериоскопические и бактериологические методы.

Микробиологическое исследование рыбы-сырца начинают прежде всего с микроскопического исследования мазков-отпечатков (бактериоскопический метод), а затем проводят бактериологический анализ.

Отбор проб. Пробы для микробиологического исследования отбираются согласно нормативной документации, от каждой партии (одного вида, сорта, наименования и т.д.).

Количество единиц упаковки, подлежащих вскрытию, устанавливается действующими НТД производства (не менее 5 % или 5 единиц от общего количества в партии).

Перед отбором пробы необходимо осмотреть всю партию, вскрыть отдельные единицы упаковки, дать органолептическую оценку продукта и после этого отобрать пробу.

Пробы для микробиологических анализов отбирают стерильным инструментом в стерильную посуду.

Пробы мелкой рыбы, нерыбных объектов морского промысла, ястыков, молок и т.д. отбирают в количестве от 3 до 10 шт. из разных мест исследуемой партии и формируют среднюю пробу.

Среднюю пробу получают путем измельчения, перемешивания и растирания отобранных образцов.

Навеску отбирают в количестве 1 г (1 см^3) из средней пробы и постепенно добавляют к ней 9 г (9 см^3) жидкости (изотонический раствор хлорида натрия), получая исходное разведение 10^{-1} . Взвесь хорошо перемешивают или взбалтывают и оставляют при комнатной температуре на 3–5 мин. Затем исследуют надосадочную жидкость. При необходимости готовят последующие разведения, используя каждый раз новую пипетку.

Отбор средней пробы икры-сырца производится в ходе технологической операции из трех мест исследуемой партии общей массой около 100 г. Отбор проб икры, расфасованной в бочки, проводят щупом из верхнего, среднего и нижнего слоев, от 3 % партии (не менее чем из 3 бочек). Разрезанные ястыки и молоки исследуют путем отбора 2–3 кусочков из разных мест общей массой около 100 г.

Крупную рыбу и крупные экземпляры нерыбных объектов морского промысла отбирают в количестве не более 3 шт. От каждого экземпляра из нескольких мест вырезают кусочки с кожей и мышцами, не затрагивая кишечник, площадью около 4 см^2 , толщиной 4–5 мм и помещают в колбу для формирования средней пробы. После разделки и мойки рыбу и объекты морского промысла отбирают и вырезают небольшими кусочками массой не более 300 г.

Каждый образец упаковывают отдельно в пергаментную бумагу, ставят дату, место взятия проб, вид рыбы, причину и цель исследования и отправляют в лабораторию.

Для скоропортящихся продуктов, к которым относятся рыба и рыбные продукты, интервал времени между отбором проб и микробиологическим анализом составляет не более 6 ч в диапазоне температуры от 0 до $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Бактериоскопическое исследование

Бактериоскопический (микроскопический) метод – совокупность способов обнаружения и изучения морфологических и тинкториальных свойств бактерий (микробов) в лабораторных условиях.

Бактериоскопическое исследование рыбы и рыбных продуктов проводят в случае расхождения результатов между биохимическими и органолептическими методами оценки. Необходимость в бактериоскопическом методе отпадает в случае отрицательного результата оценки свежести рыбы и рыбопродуктов при органолептическом анализе.

Микроскопическое исследование рыбы-сырца осуществляют отдельно для поверхности рыбы и для ее внутренних тканей.

Исследование микрофлоры поверхности рыбы

К поверхности исследуемой рыбы прикладывают профламбиро-

ванное предметное стекло и прижимают его в течение 1 мин. Стекло осторожно снимают, подсушивают, готовят фиксированный препарат и окрашивают по методу Грамма. Готовый мазок просматривают под микроскопом с иммерсионным объективом в тридцати полях зрения.

Исследование микрофлоры внутренних тканей рыбы

В теле рыбы стерильным скальпелем делают надрез, осторожно вводят в него предметное стекло. С одной стороны стекло вытирают фильтровальной бумагой, мазок на другой стороне стекла сушат, фиксируют, окрашивают по Граму. Препарат просматривают в тридцати полях зрения под микроскопом с иммерсионным объективом.

Из глубины мышц также берут мазок-отпечаток. Для этого кожу посередине спины рыбы освобождают от чешуи и прижигают раскаленным скальпелем. Стерильными ножницами и пинцетом вырезают кусочек мяса на глубине 1–1,5 см общей площадью 2 см². Вырезанным кусочком делают несколько отпечатков. На предметное стекло кусочек прикладывают разными гранями на 1 мин. Препарат сушат, фиксируют, окрашивают по методу Грама и просматривают под микроскопом с иммерсионным объективом в тридцати полях зрения.

Из каждой пробы рыбы необходимо приготовить не менее двух мазков-отпечатков.

При микроскопировании в каждом просмотренном поле зрения подсчитывают отдельно число клеток бактерий (кокков и палочек) и дрожжей; результатом является среднее значение общего количества клеток по тридцати полям зрения. Отмечают также наличие или отсутствие в поле зрения микроскопа следов распада мышечной ткани.

Результаты микроскопирования оценивают в соответствии с данными, представленными в табл. 12.

Таблица 12 - Оценка результатов бактериоскопического анализа рыбы

Характеристика рыбы	Микроскопическая картина
Свежая	Отсутствуют микробные клетки или видны единичные кокки и дрожжи (до 10 клеток); следов распада мышечной ткани нет
С частично измененной свежестью	Не более 30 кокков, дрожжей или палочковидных клеток; заметны следы распада мышечной ткани (ядра мышечных волокон в состоянии распада, исчерченность мышечных волокон слабо различима)
Несвежая	Более 30 микробных клеток с преобладанием палочковидных форм; наблюдается значительный распад мышечной ткани, почти полное исчезновение ядер и исчерченности мышечных волокон

Бактериологическое исследование

Бактериологический метод заключается в выделении и идентификации чистой культуры возбудителя (популяции).

Рыбу-сырец исследуют на общую микробную обсемененность, содержание бактерий группы кишечных палочек, присутствие сальмонелл, бактерий группы протей, энтерококков.

При бактериологическом исследовании каждую пробу освобождают от жировой и соединительной тканей, погружают в спирт, затем вырезают стерильными ножницами из глубины различных мест кусочки $2,0 \times 1,5 \times 2,5$ см. Все вырезанные кусочки измельчают стерильными ножницами. Для посева составляют средние пробы по 15 г.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ)

Общее количество микробов – это количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в 1 г (см^3) продукта. Метод определения КМАФАнМ основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре 30 ± 1 °С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения. При исследовании свежей рыбы в питательную среду засевают разведения от 10^{-1} до 10^{-4} .

Для посева 0,1 г продукта (разведение 10^{-1}) готовят первое десятикратное разведение взвеси: стерильной пипеткой набирают 1 см^3 взвеси, переносят ее в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,1 г продукта).

Для посева 0,01 г продукта (разведение 10^{-2}) готовят второе десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с первым разведением, набирают 1 см^3 и переносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,01 г продукта).

Для посева 0,001 г продукта (разведение 10^{-3}) готовят третье десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки со вторым разведением, набирают 1 см^3 и переносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,001 г продукта).

Для посева 0,0001 г продукта (разведение 10^{-4}) готовят четвертое десятикратное разведение: стерильной пипеткой перемешивают содержимое пробирки с третьим разведением, набирают 1 см^3 и переносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора (1 см^3 полученного раствора содержит 0,0001 г продукта).

В чашки Петри с заранее маркированной крышкой засевают по 1 см³ каждого разведения и заливают 10–15 см³ расплавленным и остуженным до 40–45 °С мясопептонным агаром (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашек Петри тщательно перемешивают путем легкого покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят на 72 ч в термостат при температуре 30 °С.

По окончании культивирования подсчитывают количество колоний, выросших на чашках с МПА. При этом используется лупа с увеличением в 4–10 раз или специальный прибор для подсчета колоний. При большом числе колоний и их равномерном распределении в агаре на дно чашки Петри наносят четыре или более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух-трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 см³ свежей рыбы (X) вычисляют по формуле

$$X = n \times 10^m, (5)$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;
 m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое подсчета двух чашек с разными разведениями продукта.

Определение титра бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

В настоящее время к БГКП относят следующие роды из семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*.

БГКП представляют собой мелкие, неспорообразующие палочки, располагающиеся одиночно: по методу Грама красятся отрицательно, подвижные (за исключением бактерий рода *Klebsiella*), не образующие спор и капсул (кроме бактерий рода *Klebsiella*) факультативные анаэробы. Имеют гетероферментативную каталазу и цитохромы, могут получать энергию как в процессе дыхания, так и в процессе брожения. Осуществляют муравьино-кислое брожение с накоплением CO₂ и H₂O и кислот (уксусной, молочной, янтарной).

Метод определения БГКП основан на обнаружении образования

газа или кислоты в элективной питательной среде, содержащей лактозу (среда Кесслера). Метод учета БГКП получил название бродильного метода, сущность которого заключается в посеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую питательную среду с последующим инкубированием при температуре 37 °С и обнаружении в поплавах газа с изменением цвета среды. При обнаружении газа на втором этапе исследования производят пересев материала из забродивших пробирок на среду Эндо. Для получения изолированной колонии пересев делается бактериальной петлей, густым штрихом. Чашки Петри с высевом инкубируются в течение 24 ч при температуре 27 °С, затем посевы просматриваются.

При отсутствии на среде Эндо характерных для БГКП ярких красных колоний с металлическим блеском или без него дают отрицательный ответ на наличие кишечных палочек и исследование прекращают. При обнаружении на среде Эндо колоний устанавливается принадлежность выросших микроорганизмов к семейству кишечных бактерий. Для этого из колоний готовят фиксированный препарат и окрашивают его по методу Грама.

Обнаружение бактерий рода *Proteus*

Присутствие в свежей рыбе большого количества бактерий рода *Proteus* свидетельствует о гнилостном разложении рыбных белков. Биохимические свойства видов бактерий рода *Proteus* приведены в табл. 10. При микробиологическом контроле проводят суммарное определение всех видов бактерий рода *Proteus*.

Оно проводится следующим образом: 0,5 см³ первого десятикратного разведения исследуемого образца свежей рыбы вносят в конденсационную воду свежескошенного МПА, не касаясь поверхности среды. Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат и культивируют в течение 18–24 ч при температуре 37 °С.

В случае роста бактерий рода *Proteus* на скошенном МПА культура в виде вуалеобразного налета с голубым оттенком поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды.

Из культуры готовят мазки, окрашивают их по Граму, определяют подвижность. Присутствие грамтрицательных подвижных (H-форм) мелких палочек указывает на наличие бактерий рода *Proteus*.

Выявление бактерий рода *Salmonella*

Пищевые отравления, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, занимают первое место среди микробных пищевых отравлений.

Навеску продукта объединенной пробы массой 25 г вносят во

флакон, содержащий 100 см³ среды обогащения (Кауфмана, селенитовой или хлористо-магниевого «М»), и помещают в термостат для культивирования при температуре 37 °С. Через 16–24 ч делают посев из среды обогащения на среду Эндо, распределяя материал микробиологическим шпателем по поверхности среды. Посевы культивируют в течение 20–24 ч при температуре 37 °С. На среде Эндо сальмонеллы растут в виде круглых бесцветных или слегка розовых прозрачных колоний. Из подозрительных колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму.

Определение энтерококков

К группе *Enterococcus* относятся организмы, образующие сферические или слегка овальные клетки, практически всегда грамположительные, находящиеся в жидких средах в парах или в коротких цепочках, эндоспор не образуют, подвижность не типична, факультативные анаэробы, сбраживают разнообразные углеводы с образованием молочной кислоты, снижая рН до 4,2–4,6, каталазоотрицательные.

Из заранее приготовленных первого, второго и третьего разведений исследуемой рыбы на среду Эндо с полимиксином высевают по 0,1 см³ материала. Высеянный материал растирают стерильным шпателем по поверхности питательной среды. Посевы культивируют в термостате в течение 48 ч при температуре 37 °С. По окончании культивирования просматривают и подсчитывают количество колоний, выросших на чашках со средой Эндо. Типичные колонии энтерококков имеют округлую форму, ровные края, диаметр 1,5–2 мм, блестящую поверхность, ярко-красную окраску. Подсчитывают все типичные колонии; их число пересчитывают на 1 г продукта. Из типичных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму, определяют каталазную активность.

Для определения каталазной активности на обезжиренное предметное стекло наносят каплю 1 %-го водного раствора перекиси водорода и в ней петлей растирают культуру. Если пузырьки газа не выделяются, реакция отрицательная.

В рыбе-сырце недопустимо наличие энтерококков в 0,01 г.

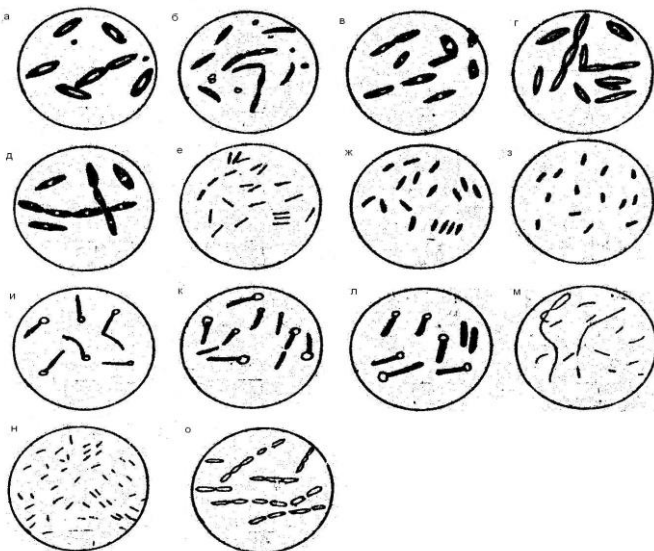


Рис. 42. Виды бактерий, вызывающих порчу рыбы:
 а – *Bac. subtilis*; б – *Bac. mesentericus*; в – *Bac. megatherium*;
 г – *Bac. mycoides*; д – *Bac. cereus*; е – *Ps. fluorescens*;
 ж – *Ps. aeruginosa*; з – *Serratia marcescens*; и – *Cl. putrificum*;
 к – *Cl. sporogenes*; л – *Cl. perfringens*; м – *Proteus vulgaris*;
 н – *E. coli*; о – уксусно-кислые бактерии

Контрольные вопросы

1. Какие методы определения доброкачественности рыбы относятся к микробиологическим?
2. В каких случаях проводят бактериоскопический анализ рыбы и рыбопродуктов?

ТЕМА 18 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ

Характеристика дрожжей, используемых в хлебопечении и в бродильных производствах

Дрожжи, используемые в хлебопечении и в бродильных производствах, относятся к семейству сахаромицетов, роду *Saccharomyces*.

Дрожжи-сахаромицеты имеют овальную форму (см. рис. 6а), размножаются в производственных условиях почкованием, а в неблагоприятных условиях – аскоспорами.

Температурный оптимум для размножения дрожжей находится в пределах 25...30 °С. Низкие температуры дрожжи переносят хорошо, хотя размножение их приостанавливается (минимальная температура развития дрожжей 2...3 °С). При температуре 40 °С рост и развитие дрожжей прекращается, дрожжи отмирают.

Культурные дрожжи относятся к ацидофилам, т. е. развиваются в кислой среде, оптимальное значение рН для дрожжей 4,5...5,0. Являются факультативными анаэробами. В аэробных условиях они активно растут и размножаются, а в анаэробных – осуществляют спиртовое брожение (эффект Пастера).

Дрожжи чувствительны к высокой концентрации растворенных в среде веществ. При высокой концентрации сахара в среде жизнедеятельность дрожжей прекращается, так как при этом увеличивается осмотическое давление среды и наступает плазмолиз клеток. Величина предельной концентрации сахара для различных рас дрожжей неодинакова.

Различают дрожжи верхового и низового брожения. *Дрожжи верхового брожения* в стадии интенсивного брожения распределяются на поверхности сбраживаемой среды в виде довольно толстого слоя пены и остаются в таком состоянии до окончания брожения. К таким дрожжам относятся спиртовые и хлебопекарные дрожжи. *Дрожжи низового брожения*, развиваясь в сбраживаемой жидкости, не переходят в поверхностный слой – пену, быстро оседают по окончании брожения, образуя плотный слой на дне бродильной емкости. К дрожжам низового брожения относятся пивные дрожжи. Такие различия при сбраживании жидких сред дрожжами верхового брожения и дрожжами низового брожения обусловлены тем, что дрожжи верхового брожения принадлежат к *пылевидным дрожжам*, не склеивающимися друг с другом, а дрожжи низового брожения относятся к *хлопьевидным дрожжам*, так как имеют клейкие оболочки, что приводит к агглютинации и быстрому осаждению клеток.

Кроме общих свойств, дрожжи, используемые в том или ином

производстве, обладают специфическими свойствами. Более того, в одном и том же производстве применяют разновидности, различающиеся по одной или нескольким технологическим особенностям. Разновидности дрожжей одного вида называют *расами*. Каждое производство располагает несколькими расами дрожжей. Основными технологическими особенностями различных рас являются величина клеток, способность сбраживать и утилизировать различные сахара.

Дрожжи, используемые в хлебопекарном производстве

Роль дрожжей в хлебопекарном производстве заключается в разрыхлении теста. Дрожжи сбраживают сахара муки и мальтозу, образуя из крахмала с выделением спирта и углекислого газа. При этом образуются побочные продукты (уксусный альдегид, бутиловый, изобутиловый, изоамиловый спирты, органические кислоты, ароматические вещества – диацетил и ацетоин, эфиры и др.), которые создают вкус и аромат хлеба.

При производстве пшеничного хлеба применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а при производстве ржаного хлеба – дрожжи двух видов *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces minor*, причем преобладают дрожжи второго вида. Дрожжи *Saccharomyces minor* отличаются более высокой кислотоустойчивостью, чем дрожжи первого вида, менее требовательны к источникам витаминного и азотного питания, более спиртоустойчивы.

Требования, предъявляемые к хлебопекарным дрожжам:

- Должны быть устойчивы к высоким концентрациям соли (до 3 – 4 %) и сахара в тесте;
- Должны хорошо размножаться при оптимальных значениях рН 4,5...5,0 и температуре 26...28 °С;
- Должны обладать высокой бродительной энергией (мальтазной и зимазной активностью). *Мальтазная активность* – это время (в мин), необходимое для выделения 10 см³ СО₂ при сбраживании 10...20 см³ мальтозы при 30 °С дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Мальтазная активность характеризует способность дрожжей гидролизовать мальтозу муки и зависит от активности содержащегося в дрожжах фермента мальтазы. Мальтазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 100 мин. *Зимазная активность* - это время (в мин), необходимое для выделения 10 см³ СО₂ при сбраживании 10...20 см³ глюкозы при 30 °С дрожжами, взятыми в количестве 2,5 % к объему среды. Зимазная активность дрожжей хорошего качества должна быть не более 60 мин. О бродительной активности хлебопекарных дрожжей можно также судить по их *подъемной силе* – периоду времени (в мин), в течение которого тесто,

замешанное на испытуемых дрожжах, поднимается до определенного уровня в формочке. Все эти показатели относятся к технологическим показателям качества хлебопекарных дрожжей;

- Должны быть стойкими к инфицированию при хранении в прессованном виде и в высушенном состоянии.

Дрожжи, используемые в бродильных производствах

Пивные дрожжи относятся к двум видам: *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis*.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются дрожжами верхового брожения и в пивоварении используются редко, в основном для темных и специальных сортов пива. Эти дрожжи в производственных условиях сбраживают сусло при 12...15 °С.

Дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* относятся к дрожжам низового брожения и в производстве осуществляют главное брожение при 5...10 °С. Они нашли широкое применение в пивоваренном производстве и используются для приготовления стандартного и сортового пива.

Требования, предъявляемые к пивным дрожжам:

- Должны обладать высокой бродильной активностью. Бродильная активность определяется степенью сбраживания сусла, т.е. отношением массы сброженного экстракта к массе сухих веществ (СВ) в начальном сусле;

- Должны обладать флокуляционной способностью, т.е. способностью медленно и полно оседать на дно бродильных аппаратов в конце главного брожения;

- Должны иметь умеренную способность к размножению. Очень активное размножение дрожжей нежелательно, т.к. при этом расходуются экстрактивные вещества сусла и образуется большое количество побочных продуктов. В среднем в процессе брожения биомасса дрожжей увеличивается в 3...4 раза;

- Должны быть стойкими к неблагоприятным условиям и инфицированию;

- Должны обладать стойкостью морфологических и физиологических свойств;

- Должны придавать пиву характерный вкус и аромат.

Спиртовые дрожжи.

В спиртовом производстве применяют дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae*.

Основными требованиями, предъявляемыми к расам дрожжей при производстве спирта являются:

- Высокая бродильная активность. Спиртовые дрожжи должны образовывать максимум спирта;
- Способность сбраживать как моносахара, так и дисахариды и некоторые декстрины;
- Способность сбраживать растворы, содержащие довольно большие концентрации сахара;
- Высокая кислотоустойчивость;
- Способность осуществлять спиртовое брожение при высоком содержании спирта в растворе.

Микрофлора производственных дрожжей

Культурные дрожжи должны быть стойкими к инфицированию. Тем не менее, посторонние микроорганизмы попадают в засевные производственные дрожжи при неправильном ведении технологического процесса, при недостаточно тщательной мойке и дезинфекции оборудования и коммуникаций, несоблюдении санитарного режима в отделении чистых культур и т.д.

Чаще всего производственным дрожжам сопутствуют молочно-кислые, уксуснокислые бактерии и дикие дрожжи, которые, так же как и культурные дрожжи, используют сахара питательной среды в качестве основного источника питания, что снижает выход спирта. Эти микроорганизмы образуют органические кислоты и другие продукты, которые могут отрицательно влиять на органолептические показатели готовой продукции (хлеба, пива) и бродильную активность культурных дрожжей. Хлебопекарные дрожжи, инфицированные посторонними микроорганизмами, имеют низкую ферментативную активность и стойкость.

Молочнокислые бактерии чаще других микроорганизмов встречаются в производственных дрожжах. Они принадлежат к трем родам: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*. Стрептококки и лейконостоки имеют шаровидную форму клеток. Стрептококки располагаются друг относительно друга попарно, короткими и длинными цепочками, а лейконостоки в основном попарно. Отличием этих двух родов друг от друга является то, что лейконостоки в отличие от стрептококков образуют слизистые капсулы. Лактобациллы являются палочковидными бактериями, которые в зависимости от вида могут располагаться поодиночке или короткими цепочками. Общими признаками этих бактерий являются грамположительная окраска, отсутствие спорообразования, каталазу они не образуют, не восстанавливают нитраты в нитри-

ты, являются факультативными анаэробами. Молочнокислые стрептококки хорошо развиваются в средах, содержащих 3...6 % спирта, а палочковидные формы молочнокислых бактерий не теряют своей активности даже при 10...12 % спирта.

Уксуснокислые бактерии относятся к двум родам *Acetobacter* и *Glucanobacter*. В производстве пива чаще всего встречаются бактерии вида *A. aceti*. Для этих бактерий характерна чрезвычайная изменчивость формы клеток – от эллиптических до палочковидных, прямых или слегка изогнутых. Грамотрицательные, спор не образуют, некоторые виды имеют слизистую капсулу. При росте в жидкой среде образуют пленки беловатого или сероватого цвета. Реакция на каталазу положительная. Аэробы. Оптимальное значение pH 5,4-6,3, но могут расти и при pH 4,0-4,5. Эти бактерии устойчивы к антисептическим веществам хмеля, высокой кислотности, толерантны к спирту. Некоторые виды выделяют соединения, токсичные для дрожжей.

В пивоваренном производстве в засевных производственных дрожжах очень часто встречаются пивные сарцины (род Pediosoccus). Сферические клетки (кокки) в парах, чаще в тетрадах или пакетах. Бесспорные, грамположительны. Факультативные анаэробы. Каталазоотрицательные. Мезофилы. Оптимальное значение pH 4,5-5,0. Могут развиваться при содержании спирта до 8%. Лучшие всего растут в присутствии дрожжей. Пивные сарцины вызывают сильное помутнение пива, сначала опалисцирующее, а затем с появлением мелкозернистого осадка. Иногда происходит увеличение вязкости пива и даже его ослизнение. Вследствие образования диацетила эти бактерии придают пиву характерный прогорклый маслянистый вкус и медовый аромат. Диацетил также отрицательно влияет на рост и размножение производственных дрожжей, ускоряет их оседание и отмирание. Развитие педиококков стимулирует образование продуктов распада белков, а также тиамина и рибофлавина, синтезируемых дрожжами.

Дикие дрожжи инфицирующие производственные дрожжи принято подразделять на две группы:

- Дикие дрожжи, принадлежащие к роду *Saccharomyces*;
- Дикие дрожжи, не принадлежащие к роду *Saccharomyces*.

При попадании в сусло на стадии брожения дикие дрожжи не могут интенсивно развиваться, так как их рост подавляется культурными дрожжами, количество которых по сравнению с содержанием инфицирующих пиво диких дрожжей значительно больше.

Дикие дрожжи, принадлежащие к роду Saccharomyces

В чаще всего встречаются следующие разновидности диких дрожжей-сахаромицетов: *S. diastaticus*, *S. pastorianum*, *S. bayanus*, *S. ellipsoideus*. В настоящее время все эти дрожжи принято относить к одному виду *Saccharomyces cerevisiae*, так как с точки зрения систематики различия в их признаках не являются существенными для разграничения видов. Клетки этих дрожжей имеют овальную или эллиптическую форму. Размножаются в основном почкованием, но могут и спорообразованием. Факультативные анаэробы. Активно сбраживают сахара. Оптимальная температура развития 27-35 °С, pH – от 3,5 до 5,0.

Дикие дрожжи, не относящиеся к роду Saccharomyces

Из производственных дрожжей выделены следующие дрожжи этой группы: дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula* и др.

Дрожжи рода *Candida* имеют круглые, овальные или яйцевидные, а иногда удлинённые или неправильные формы клеток. Морфология клеток непостоянна и существенно меняется в зависимости от условий культивирования и питательной среды. Спор не образуют. На жидких средах развиваются преимущественно на поверхности в виде белой или сероватой пленки. Некоторые виды являются факультативными анаэробами, а другие – аэробами. Размножению большинства видов способствует присутствие в среде кислорода. Некоторые дрожжи этого вида продуцируют специфический белок, губительно воздействующий на культурные дрожжи (дрожжи-убийцы).

Дрожжи родов *Pichia* и *Hansenula* имеют клетки различной формы – от круглых и овальных до сильно вытянутых, иногда изогнутых. Многие виды образуют псевдомицелий. Образуют споры. Большинство видов – аэробы, некоторые виды относятся к факультативным анаэробам. Размножению способствует присутствие кислорода.

Дрожжи рода *Rhodotorula* обычно круглой, овальной, яйцевидной или удлинённой формы Спор не образуют.

Дрожжи рода *Torulopsis* (пивная торула) имеют круглую или овальную форму. Спор не образуют, плохо сбраживают сахара. Основным источником попадания этих микроорганизмов в производство является воздух.

Дрожжи рода *Brettanomyces* имеют клетки эллиптические, а также цилиндрические, удлинённо-продолговатые, нередко стрелозаостренные с одного конца. Образуют псевдомицелий. Спор не образуют. Являются факультативными анаэробами. Плохо сбраживают сахара. На жидких средах образуют хлопьевидный или вязкий осадок, мо-

гут образовывать тонкую пленку. Многие виды устойчивы к высоким концентрациям спирта.

Помимо вышеперечисленных групп микроорганизмов, инфицирующих производственные дрожжи, в них могут присутствовать *гнилостные бактерии*. Это спорообразующие грамположительные бациллы и клостридии и грамотрицательные не образующие спор палочковидные бактерии. Гнилостные бактерии вызывают распад белковых веществ. В аэробных условиях они осуществляют полную минерализацию белка, вплоть до диоксида углерода, аммиака, сероводорода, воды и минеральных солей. В анаэробных условиях гнилостные бактерии образуют различные органические дурнопахнущие и ядовитые вещества. Особую опасность представляют маслянокислые бактерии (*Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium saccharobutyricum* и др.) и нитритобразующие бактерии (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*). Маслянокислые бактерии образуют масляную кислоту, а нитритобразующие бактерии превращают нитраты в нитриты. Эти соединения даже в очень малых концентрациях (0,0005 %) подавляют развитие культурных дрожжей.

Биологическая чистота является одним из самых важных показателей качества производственных дрожжей. Особое значение этот показатель имеет в пивоваренном производстве. Это связано с тем, что в пивоварении засевные производственные дрожжи используются в нескольких производственных циклах (до 10..12 генераций) и поэтому являются основным источником попадания в производство микроорганизмов-вредителей, вызывающих прокисание, помутнение, образование осадка в пиве и придающих продукту неприятные вкус и аромат. Биологическая чистота пивных дрожжей считается удовлетворительной, если в них содержится не более 1 % бактерий и не более 0,5 % диких дрожжей.

Микробиологический контроль качества производственных дрожжей

В пивоваренном производстве при контроле засевных дрожжей основным методом исследования является их *микроскопирование*. При микроскопировании дрожжевой суспензии определяют морфологическое состояние дрожжей, способность дрожжей к размножению, процентное содержание мертвых клеток, наличие посторонних микроорганизмов, содержание в дрожжах запасных питательных веществ (гликогена и волютина). В дрожжах хорошего качества морфологическое состояние должно быть удовлетворительным. Процентное содержание почкующихся клеток - высокое (40...70%), дрожжей, содержащих гликоген должно быть не менее 70...75%; биологическая чистота - удо-

влетворительная (не более 1% бактерий и 0,5% диких дрожжей), количество мертвых клеток – не более 5% . В дрожжах чистой культуры должны отсутствовать посторонние микроорганизмы и мертвые дрожжевые клетки. В засевных производственных дрожжах целесообразно также определять концентрацию дрожжевых клеток. Это исследование проводят с использованием счетной камеры Горяева.

Определение биологической чистоты дрожжей ведут также *путем посева* разведение из дрожжевой суспензии *плотные питательные среды*. Количество инфицирующих бактерий в засевных дрожжах определяется с использованием сусло-агара или дрожжевого агара с 1% глюкозы с мелом и антибиотиками (нистатином или актидионом). Для обнаружения диких дрожжей рода *Saccharomyces* исследуемые пробы прогревают при 50 °С в течение 20 мин, а затем высевают на агар с ацетатом. В качестве элективных сред для этих дрожжей можно также использовать агар с кристаллвиолетом, сусло с 2% винной кислоты или 10% раствор глюкозы с 4% винной кислоты. Дрожжи, не относящиеся в роду *Saccharomyces*, определяют на синтетической среде с лизином. Рецептуры этих сред приведены в приложении 2.

В производстве спирта засевные производственные дрожжи регулярно просматривают под микроскопом, что дает возможность следить за их размножением, морфологическим и физиологическим состоянием, а также степенью загрязнения посторонними микроорганизмами. В засевных дрожжах количество почкующихся клеток должно быть не более 3%. Так как производственные дрожжи готовятся в не стерильных условиях, в них может присутствовать некоторое количество бактерий. О инфицировании засевных дрожжей кислотообразующими бактериями (молочнокислыми, уксуснокислыми) свидетельствует повышение титруемой кислотности более чем на 0,05 град. В сильно инфицированных дрожжах могут быть подвижные спорообразующие бактерии, распознавание которых осуществляют путем окраски раствором йода (маслянокислые бактерии при этом окрашиваются в серо-голубой цвет). Обращают также внимание на наличие диких дрожжей, количество мертвых клеток (не более 5%). Учитывают также упитанность дрожжей по гликогену - в нормальных дрожжах гликоген занимает от 1/3 до 2/3 объема клетки. Если гликогена меньше 1/4 объема клетки, его содержание считается недостаточным.

Путем микроскопирования определяют также процентное содержание мертвых и почкующихся клеток и концентрацию дрожжевых клеток в бражке. Значения этих показателей в процессе брожения меняется. Так, в первые часы брожения концентрация дрожжевых клеток в бражке составляет 100 – 150 млн./см³, почкующихся клеток –

10...12%, мертвых – до 3...4%. В дальнейшем концентрация дрожжевых клеток и процентное содержание мертвых клеток увеличивается, а относительное содержание почкующихся клеток уменьшается.

Для установления степени инфицирования бражки посторонними микроорганизмами ее исследуют под микроскопом не реже 3 раз в сутки (из каждого бродильного аппарата). В первые часы брожения посторонние микроорганизмы должны отсутствовать, в период главного брожения допускается наличие единичных клеток, а при дображивании – 3...5 клеток посторонних микроорганизмов в поле зрения микроскопа.

Микробиологический контроль *хлебопекарных прессованных дрожжей* включает:

- *Микроскопирование*. При микроскопировании оценивают качество прессованных дрожжей – по величине, по однородности клеток и по наличию посторонних микроорганизмов (бактерий, диких дрожжей), процентному содержанию мертвых клеток.

- *Определение процентного содержания сахаромыцетов и посторонних микроорганизмов с использованием плотных питательных сред* проводят в случае резкого ухудшения подъемной силы и при снижении стойкости прессованных дрожжей.

- *Упрощенный метод* – посев на сусло-агар с мелом (подсчитывают общее количество выросших на среде колоний и отдельно - колонии кислотообразующих бактерий, вокруг которых имеются зоны растворения мела).

- *Усложненный метод* – посев на несколько селективных питательных сред для выявления количества клеток посторонних микроорганизмов и распределения их по группам. В качестве селективных сред используют сусло-агар (8 % СВ) – для определения общего количества дрожжей и грибов; сусло-агар (12 % СВ) с мелом и нистатином (для определения молочнокислых бактерий); среда 10 на дрожжевой воде (для определения слизиобразующих бактерий – лейконостоков); молочный агар с нистатином (для определения гнилостных бактерий); дрожжевой агар с 4 % сахарозы и нистатином (для определения общего количества бактерий); синтетическая среда с лизином (для определения несовершенных дрожжей) и др. Состав этих сред и особенности их приготовления приведены в приложении 2. Общее количество дрожжей принимают за 100 % и определяют процентное содержание посторонних видов дрожжей, грибов и бактерий. В доброкачественных прессованных дрожжах допускается присутствие кислотообразующих бактерий не более 15...35 %, гнилостных дрожжей быть не должно, посторонних (диких) дрожжей – не более 30 %.

Определение биологической чистоты дрожжей

Готовят фиксированных мазок из густой дрожжевой суспензии. Окрашивают его по Граму или простым методом. Далее препарат микрофотографируют в иммерсионной системе с использованием объектива х90. Рассматривают препарат в 10 полях зрения. При микрофотографировании обращают внимание на наличие посторонних бактерий и диких дрожжей.

Определение биологической чистоты можно также вести путем приготовления препарата «раздавленная капля» с использованием фазово-контрастного микроскопа. В этом случае на предметное стекло наносят каплю дрожжевой суспензии и добавляют каплю 10% раствора КОН или 50% уксусной кислоты для растворения белков и жировых частиц, что облегчает просмотр препарата. Далее накрывают препарат покровным стеклом и микрофотографируют с объективом х40 и рассматривают в 20 полях зрения. В поле зрения должно быть около 50 клеток дрожжей.

Определение морфологического состояния дрожжей

Ведут путем микрофотографирования препарата «раздавленная капля» в затемненном поле зрения микроскопа с объективом х40. Для этого на предметное стекло наносят каплю разбавленной дрожжевой суспензии и накрывают ее покровным стеклом. Излишки воды удаляют фильтровальной бумагой.

При микрофотографировании обращают внимание на форму, размеры клеток, толщину оболочек, структуру цитоплазмы, наличие почкующихся клеток.

Дрожжи должны иметь форму и размеры, соответствующие применяемой расе. Клетки должны быть равномерной величины, с тонкой оболочкой, однородной или мелкозернистой цитоплазмой, небольшими вакуолями. Количество почкующихся клеток в засеваемых дрожжах, используемых в пивоварении должно составлять 40...70%. Наличие большого количества морфологически измененных клеток свидетельствует о дегенерации культуры, поэтому такие дрожжи использовать в производстве не рекомендуется. Зернистая цитоплазма, крупные вакуоли и отсутствие почкующихся клеток характеризует старую культуру.

Определение процентного содержания мертвых клеток

На предметное стекло наносят каплю разбавленной дрожжевой суспензии и каплю раствора синьки Финка (раствор метиленового синего концентрацией 1:5000). Через 2 мин препарат накрывают покровным стеклом, излишки воды убирают с помощью фильтровальной бумаги. Микрофотографирование ведут в 5 полях зрения. При этом подсчи-

тывают количество всех дрожжевых клеток, а также отдельно считают количества мертвых (окрашенных в синий цвет) клеток. Далее рассчитывают процентное содержание мертвых клеток.

Определение мертвых клеток в дрожжевой суспензии можно проводить и с помощью водного раствора красителя нейтрального красного в концентрации 1:10000. При этом мертвые клетки окрашиваются в красный цвет, а в живых клетках окрашиваются только включения цитоплазмы. При окрашивании дрожжевой суспензии раствором нейтрального красного микрофотографирование ведут через 15 мин после окраски.

4 Определение запасных веществ (гликогена, волютина) в клетках дрожжей

Основными запасными веществами дрожжевой клетки являются гликоген и волютин (зерна метакроматина).

Гликоген – запасной полисахарид дрожжевой клетки. По содержанию гликогена судят об упитанности дрожжей. Если гликогена в дрожжах мало, то это свидетельствует о том, что они длительное время находились без питательного субстрата и имеют поэтому низкую бродительную активность.

Волютин – запасной полифосфат в соединении с простыми белками и рибонуклеиновой кислотой. В состоянии активного обмена волютин в клетках дрожжей располагается мелкими каплями по стенкам вакуолей или непосредственно под клеточной стенкой. В больших количествах волютин накапливается перед почкованием. Накопление волютина особенно интенсивно происходит при выращивании дрожжей на средах, богатых фосфатами.

Определение гликогена

Для определения гликогена на предметное стекло наносят каплю разбавленной дрожжевой суспензии и каплю 0,5% раствора йода. Через 2...3 мин цитоплазма клеток окрашивается в светло-желтый цвет, а гранулы гликогена – в красно-бурый. Препарат накрывают покровным стеклом и удаляют излишек жидкости фильтровальной бумагой и микрофотографируют с объективом х40.

Определение волютина методом Омелянского

1. Готовят фиксированный мазок из густой дрожжевой суспензии;
2. Препарат в течение 30...60 сек окрашивают раствором фуксина Циля;
3. Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой;
4. Мазок обрабатывают 1%-ным раствором H_2SO_4 в течение 20...30 сек, при этом клетки обесцвечиваются, а волютин, так как он

устойчив к действию кислот, сохраняет окраску;

5. Препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой;

6. Дополнительно докрашивают мазок метиленовым синим (1:40) в течение 15...30 сек, промывают его водой и подсушивают фильтровальной бумагой;

7. Препарат микрокопируют в иммерсионной системе с объективом $\times 90$.

Микроскопическая картина: гранулы волютина красного цвета, клетки – синего.

5 Определение концентрации дрожжевых клеток с помощью счетной камеры Горяева

Для подсчета клеток в дрожжевой суспензии используют счетные камеры Горяева, Тома-Цейса, Бюркера и др.

Счетная камера Горяева (рис. 43) представляет собой толстое предметное стекло, разделенное четырьмя прорезями на три поперечно расположенные площадки. Центральная площадка продольной прорезью делится пополам. На каждой половинке выгравирована микроскопическая сетка. Сетка разделена на большие и малые квадраты: площадь большого квадрата равна $1/25 \text{ мм}^2$, малого – $1/400 \text{ мм}^2$. Боковые площадки расположены на 0,1 мм выше центральной (глубина камеры) и служат для притирания покровного стекла.

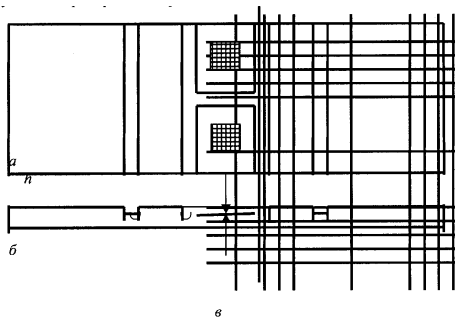


Рис. 43. Счетная камера Горяева:

а - вид сверху; *б* - вид сбоку; *в* - деление камеры на квадраты; *h* - глубина камеры

При работе с камерой необходимо соблюдать определенный порядок ее заполнения. Вначале углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. Это указывает на то, что покровное стекло притерто к сторонам камеры. После этого заполняют камеру исследуемой дрож-

жевой суспензией. Суспензию вносят через бороздки камеры капилляром и пипеткой. Подсчет клеток производят через 3...5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости.

Камеру помещают на предметный столик и рассматривают в затемненном поле зрения с объективами вначале на х8, а затем на х40. Клетки подсчитывают в 10 больших или в 20 маленьких квадратах, перемещая их по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки и на пограничных линиях, если они больше, чем наполовину лежат внутри квадрата. Клетки, пересеченные пограничной линией пополам, считают только на двух их четырех сторон квадрата. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20.. .30, а в малом - 10, в противном случае делают разведение.

Количество клеток в 1 см³ исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = a \cdot n \cdot 10^3 / S \cdot h,$$

где M - число клеток в 1 см³ дрожжевой суспензии;

a - среднее число клеток в квадрате сетки;

n - разведение дрожжевой суспензии (если оно применялось);

S - площадь квадрата сетки, мм²;

h - глубина камеры.

Пример: При подсчете взвеси дрожжей в камере Горяева обнаружено 20 дрожжевых клеток в одном большом квадрате. Густая взвесь предварительно была разведена 1:100. Следовательно, $M = 20 \cdot 1000 \cdot 25 \cdot 100 / 0,1 = 5,0 \cdot 10^8$ кл/см³.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте морфологические и физиологические свойства дрожжей - сахаромицетов.
2. В чем отличие дрожжей верхового брожения от дрожжей низового брожения?
3. В каких производствах используются дрожжи верхового брожения, а в каких - низового брожения?
4. Какие дрожжи используются в производстве пшеничного и ржаного теста? Перечислите требования, предъявляемые к хлебопекарным дрожжам.
5. Какими производственно-ценными свойствами должны обладать пивные дрожжи?
6. Дрожжи какого вида используются в производстве спирта? Каким требованиям должны удовлетворять спиртовые дрожжи?
7. Какие микроорганизмы чаще всего инфицируют производственные дрожжи? Каким образом можно определить посторонние

микроорганизмы в производственных дрожжах?

8. Какие микробиологические показатели определяются при контроле качества засевных производственных дрожжей в пивоваренном производстве, в производстве спирта? Как осуществляют микробиологический контроль хлебопекарных дрожжей?

9. Как определить концентрацию клеток в дрожжевой суспензии?

10. Как и для чего определяется гликоген в клетках дрожжей?

ТЕМА 19 МИКРОБИОЛОГИЯ ПИВА, ВИНА, БЕЗАЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ

Пиво - древнейший из напитков, изготавливаемый и потребляемый человеком более 5000 лет назад. Основателями пивоварения считают древних египтян.

Микробиологические процессы происходящие в пиве, в первые были исследованы Л. Пастером, который на протяжении нескольких лет изучал «болезни» пива, связанные с влиянием посторонней микрофлоры на процессы брожения. Датский исследователь Э. Ганзен ввел в производство пива чистые культуры дрожжей и дал им первое научное название *Saccharomyces cerevisiae*, которое отражает их грибную природу и связь с пивоварением. По названию Карлсбергской лаборатории в Копенгагене, которая рассылала пивные дрожжи во все страны мира, их называют еще *Saccharomyces carlsbergensis*.

Технология изготовления пива

Основным сырьем для пивоварения являются пророщенные зерна ячменя. Для их получения зерна высококачественного ячменя насыпают слоем в несколько сантиметров, увлажняют и проращивают. Искусственно пророщенные зерна называют солодом. Во время прорастания в зернах образуются ферменты, используемые в дальнейших процессах. Солод высушивают, перемалывают и смешивают с водой. Температуру постепенно повышают (от 40 до 70 °С), в действие вступают ферменты, разлагающие крахмал на сахара, которые переходят в раствор, туда же попадают компоненты белков и минеральные соли. Полученную смесь кипятят, твердые частицы (дробину) отфильтровывают, а в оставшуюся чистую жидкость (сусло) кладут шишки хмеля и снова варят. Из хмеля экстрагируются различные соединения, которые придают жидкости особый аромат и обладают бактерицидными свойствами. Жидкость фильтруют, в результате получается раствор, со-

державший различные сахара, преимущественно глюкозу, аминокислоты, минеральные соли и другие вещества. Этот раствор и служит питательной средой для дрожжей, которые в него засевают. Брожение протекает в больших бродильных чанах при температуре около 10 °С в течение 10 дней, при более высокой температуре (15...23°С) брожение продолжается около недели. На поверхности бродящей жидкости в результате освобождения диоксида углерода образуется пена.

Перебродившее таким образом пиво еще непригодно к употреблению и после отделения дрожжей должно в течение нескольких недель дозревать в больших сосудах при температуре около 0°С. За это время процесс брожения постепенно заканчивается, некоторые вещества осаждаются, их уstraняют, а в пиво вводят под давлением диоксид углерода, способствующий образованию пены и обеспечивающий более длительную сохранность. Пиво разливают в бутылки, банки, где оно подвергается пастеризации.

Виды порчи пива

В пиве могут развиваться только определенные виды микроорганизмов, приспособленные к существованию в специфических условиях пивоваренного производства. Микробные вредители пива представлены как грамположительными, так и грамотрицательными микроорганизмами.

Порчу пива вызывают *Lactobacillus*, *L. delbrueckii*, *Pediococcus*, уксуснокислые бактерии и др.

Молочнокислые палочки *Lactobacillus* (лактобациллы) обнаруживаются на всех стадиях производства. Они попадают в пиво с сусликом, засевными дрожжами, загрязненной одеждой рабочих, недостаточно чистой водой. В фильтрованном и разлитом пиве эти микроорганизмы образуют шелковистую муть, повышают кислотность, ухудшают вкус и аромат за счет накопления продуктов метаболизма. Некоторые виды могут вызывать ослизнение пива. Лактобациллы — короткие и длинные палочки, единичные или парные, аспорогенные, неподвижные, растут при пониженных температурах, факультативные анаэробы или микроаэрофилы, устойчивые к спирту, кислотам и антисептическому действию хмеля. Остаточные углеводы и аминокислоты в пиве стимулируют их развитие.

Термофильные молочнокислые бактерии *L. delbrueckii* могут размножаться при охлаждении суслика до 50-54 °С и вызывать его прокисание, в охмеленном пиве они не развиваются.

Бактерии *Pediococcus* (педиококки), или пивные кокки являются

грамположительными анаэробами. Встречаются как одиночные клетки, так и клетки, соединенные по две, по четыре в виде коротких цепочек или комочков. Оптимальной для развития педиококков является температура 21... 25 °С, но они могут расти и при 7 °С, а также и при 45 °С. К спирту нечувствительны. В пиве образуют муть, осадок, оптически неактивную молочную кислоту или диацетил, иногда вызывают ослизнение. При образовании педиококками диацетила происходит «сарцинное» заболевание пива: пиво приобретает неприятный вкус и характерный медовый запах.

Из грамотрицательных бактерий вредителями пива являются уксуснокислые бактерии, которые образуют на поверхности пива пленку беловатого или серого цвета, а спирт окисляют в уксусную кислоту.

Вино. Основные изменения качества вина происходят под влиянием молочнокислых бактерий, вызывающих помутнение вин и приводящих к заболеваниям, которые существенно ухудшают органолептические и физико-химические показатели вина, вплоть до полной его непригодности. Ухудшение качества вина может начаться при повышении рН. Сильным ингибитором жизнедеятельности молочнокислых бактерий является сернистый ангидрид SO₂.

Сложность предотвращения бактериального инфицирования вина и его последствий заключается в том, что эти явления не сразу удается распознать, так как концентрация бактерий может быть низкой, наблюдается лишь легкая опалесценция, или небольшое слизееобразование. Когда же количество бактерий и образование видимых помутнений достигает максимума, в вине уже происходят глубокие изменения, которые трудно или практически невозможно исправить.

Основными видами порчи вина являются его ожирение, прогоркание, разложение винной кислоты, молочнокислое брожение.

Ожирение (ослизнение) вина вызывают бактерии *Pediococcus* и *Leiconostoc*. Вино становится вязким, льется бесшумно, как маслянистая жидкость. Как правило, поражаются белые вина с невысоким содержанием дубильных веществ. Заболевание может поражать и красные вина. Под действием бактерий содержащийся в вине сахар превращается в полисахариды. Иногда для устранения повышенной вязкости вина достаточно ввести дополнительную дозу SO₂.

Прогоркание вина вызывается разложением глицерина и образованием акролеина, который затем вступает в химические реакции с образованием горьких веществ. Разлагают глицерин бактерии *Lactobacillus brevis*. Прогорканию чаще подвержены красные вина, богатые дубильными веществами. Вино теряет блеск, мутнеет, во вкусе

ощущаются тона горечи. Цвет вина изменяется, красящие вещества выпадают в осадок. Вино становится непригодным к употреблению.

Разложение винной кислоты (турн) вызывают *Bacterium tartarophthorum*. В нормальных условиях винная кислота микроорганизмами не разлагается. Обычно снижение содержания винной кислоты происходит при выпадении в осадок солей винной кислоты — тартратов — в процессе брожения или при обработке вина.

Бактерии разлагают винную кислоту до уксусной кислоты и диоксида углерода. Вино мутнеет, становится плоским, у красных вин разрушаются красящие вещества, повышается содержание летучих кислот. Вино становится непригодным к употреблению.

Молочнокислородное брожение вина вызывают как гомоферментативные, так и гетероферментативные молочнокислородные бактерии. Молочнокислородное брожение широко распространено и опасно. Заболевают вина, содержащие восстанавливающие сахара. Вино теряет блеск и прозрачность, при взмучивании вина со дна сосуда поднимаются характерные шлейфообразные скопления бактерий. Вкус вина изменяется, в нем появляются уксусный привкус, ацетамидный или квашеный тон. Вино становится непригодным к употреблению.

Для предотвращения бактериальных заболеваний вин необходимо строго соблюдать санитарно-гигиенические требования производства, проводить пастеризацию вина, обесплескивающую фильтрацию, осуществлять процесс брожения на чистых культурах дрожжей при низких температурах, своевременное сульфитирование.

Безалкогольные напитки. Безалкогольные напитки различной природы, состава, органолептических свойств и технологии производства служат для утоления жажды человека и оказывают освежающее действие. Сухие вещества таких напитков разнообразны и зависят от типа напитка и его рецептуры. Освежающий эффект обусловлен содержанием в них диоксида углерода и органических кислот, добавленных или образующихся в процессе производства напитка.

Питательная ценность безалкогольных напитков зависит от содержания в них Сахаров (глюкозы, фруктозы, сахарозы); многие напитки обладают лечебным действием, например напитки из шиповника, минеральные воды и напитки, приготовленные на основе минеральных вод. Микроорганизмы (бактерии, дрожжи, споры плесневых грибов) попадают в них в основном с используемым сырьем и из окружающей среды (в природные минеральные воды). В эпидемиологически безопасных безалкогольных напитках присутствие микроор-

ганизмов должно быть таким же, как в питьевой воде: КМАФАнМ не более 100 КОЕ/мл, коли-титр 333 мл.

Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, должны отсутствовать в 100 мл.

К безалкогольным напиткам относится и квас, который истари считался лучшим освежающим напитком. Квас популярен и в настоящее время.

В хлебном квасе на чистых культурах не предусмотрено определение КМАФАнМ, БГКП не допускаются в 1 мл, а патогенные микроорганизмы — в 25 мл. В 0,1 мл кваса, приготовленного с использованием хлебопекарных дрожжей, БГКП должны полностью отсутствовать.

ТЕМА 20 **МИКРОБИОЛОГИЯ СПЕЦИЙ И ПРЯНОСТЕЙ**

В кулинарии национальных кухонь мира используют более 150 различных видов пряностей, из которых около 20 получили признание у всех народов мира и применяются с глубокой древности. Это классические пряности, употребляемые в предварительно обработанном путем ферментации, сушки, кипячения, очистки и т.п. сухом виде, что позволяет их долго хранить и перевозить на большие расстояния. Пряности имеют сильный, ярко выраженный, устойчивый аромат, специфичный для каждого вида пряностей, и жгучесть. Пряности имеют широкий диапазон использования и высоко ценятся на мировом рынке.

Классические пряности подразделяют на следующие группы:

семена: горчица, мускатный орех;

плоды: ваниль, перец (черный, белый, душистый, красный), бадьян, кардамон;

цветы и их части: гвоздика, шафран;

листья: лавровый лист;

корица: корица, кассия;

корни: имбирь, куркума, галаган.

В последние годы созданы искусственные (синтетические) пряности, изготавливаемые взамен дорогостоящих натуральных классических пряностей: ванилин, синтетические коричный экстракт, порошкообразные заменители корицы, гвоздики, мускатного ореха и шафрана. Все искусственные пряности не обладают полной гаммой оттенков аромата, присущего натуральному продукту.

В сухих специях и пряностях обнаруживают КМАФАнМ, БГКП, мезофильные сульфитредуцирующие кластридии, плесневые грибы и

патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, содержание которых должно быть следующим: КМАФАнМ - $5 \cdot 10^5 \dots 2 \cdot 10^6$ КОЕ/г, не более; БГКП — не допускаются в массе продукта 0,1 ...0,001 г; мезофильные сульфитредуцирующие клостридии — не допускаются в массе 0,01 г; плесневые грибы — не более $1 \cdot 10^3 \dots 1 \cdot 10^4$ КОЕ/г; патогенные бактерии — не должны обнаруживаться в 25 г.

ТЕМА 21 МИКРОБИОЛОГИЯ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Основным источником углеводов для человека в настоящее время являются кондитерские изделия, которые подразделяются на сахаристые и мучные.

К сахаристым относятся конфеты, карамель, шоколад, мармелад, пастила, зефир, ирис, драже, восточные сладости и др.

К мучным кондитерским изделиям относятся печенье, пряники, пирожные, кексы, вафли, рулеты и др.

При производстве кондитерских изделий широко используется видоизмененный сахар и другие сладкие вещества (мед, ксилит, сорбит), а кроме того патока, инвертный сироп, фруктово-ягодное пюре, сливочное масло, молоко, сливки, какао, ядра орехов, пектин, мука, красители, эссенции, кислоты, пряности и др. Все они могут служить причиной обсеменения разнообразными микроорганизмами кондитерских изделий.

Например, в сахаре обнаруживаются различные виды осмофильных дрожжей из родов сахаромицес и торулопсис, споры термофильных бактерий (*Bac. steawthermophilus*), мезофильные бактерии (*Bac. subtilis* и *Bac. mesentericus*), капсульные бактерии (*Leiconostoc*), споры плесневых грибов.

В молоке и сливках всегда содержится большое число разнообразных микроорганизмов: молочнокислые, гнилостные, кишечная палочка, часто присутствуют и патогенные.

В сливочном масле, меланже, яичном порошке, муке и других видах сырья также содержится много микроорганизмов. В настоящее время проводится систематический микробиологический и санитарный контроль кондитерского производства. В готовых кондитерских изделиях (конфеты, драже, карамель, мармелад и др.) число микроорганизмов может быть $5 \cdot 10^2 \dots 5 \cdot 10^4$ КОЕ/г.

Наиболее распространенными микробиологическими видами порчи кондитерских изделий являются: взрыв, вызванный осмофиль-

ными дрожжами (помадные конфеты, сбивные изделия), и плесневение многих мучных изделий (пряники, рулеты).

В кондитерские изделия, изготовленные с использованием сливочного масла, может попасть стафилококк (*Staph.aureus*), который вызывает пищевое отравление.

Плесневые грибы, попавшие и развивающиеся на поверхности мучных изделий, вырабатывают микотоксины, которые вызывают пищевые отравления.

Отдельную обширную группу кондитерских изделий составляют шоколад и шоколадные конфеты.

Шоколад известен с древних веков. Первые плантации какао-бобов появились в Юкатане (США) в VI в. до н.э., когда индейцы племени майя переселились в северные районы Южной Америки. Возможно, какао-бобы были известны майя еще за несколько веков до этого. Ацтеки и майя использовали какао в виде напитка, называемого ксоколатл (горькая вода). Его давали храбрым воинам как награду и средство, удерживающее от трусости. Какао-бобы были настолько ценны, что использовались в качестве валюты.

Европейцам шоколад стал известен в начале XVI в. После 1650 г. шоколад стал продаваться во всех крупных городах Европы, но только богатые и знатные люди могли позволить себе пить шоколад, поскольку его называли жидкие деньги. Вплоть до середины XIX в. шоколад потреблялся в виде напитка, похожего на тот, который мы сегодня называем какао.

В 1657 г. открылся первый специализированный магазин по продаже шоколада в Лондоне, в 1756 г. — в Германии, в 1819 г. — в Швейцарии.

Твердый шоколад появился в Европе в 1828 г., когда был изобретен способ выделения какао-масла и какао-порошка. Путем смешивания какао-масла и сахарной пудры был получен твердый плиточный шоколад.

В 1868 г. в Москве была основана крупнейшая российская кондитерская фабрика «Товарищество Эйнем» — ныне «Красный Октябрь». С этого года начинается всемирная слава русского шоколада. Именно русские мастера стали добавлять в шоколад ликеры, вина, коньяки, орехи и другие вкусные и полезные добавки. В начале XX в. производители русского шоколада получали самые престижные награды на всех всемирных выставках, проводившихся вплоть до начала Первой мировой войны.

В шоколаде могут встречаться КМАФАНМ, БГКП, дрожжи, плесневые грибы, причем в шоколаде обыкновенном и десертном без

начинки допускается содержание КМАФАнМ $1 \cdot 10^4$ КОЕ/г, дрожжей и плесневых грибов — не более 50 КОЕ/г, БГКП в 0,1 г

не допускается. В шоколаде с начинкой, а также в шоколадных конфетах допускается КМАФАнМ 5-104 КОЕ/г, дрожжей — не более 50 КОЕ/г, плесневых грибов — не более 100 КОЕ/г, БГКП в 0,1 г не допускается.

По объему продукции второе место после сахаристых кондитерских изделий занимают мучные. Их удельный вес в общем производстве кондитерских изделий составляет более 40 %.

Мучные кондитерские изделия характеризуются большим разнообразием состава и свойств. Производство их осуществляется на предприятиях кондитерской и хлебопекарной промышленности, предприятиях общественного питания и других, имеющих механизированные поточные линии. Мучные кондитерские изделия различаются рецептурой, режимом изготовления, структурой. В зависимости от рецептуры и способа производства их подразделяют на две группы: изготовленные из одного вида теста: печенье, галеты, крекеры, сдобное печенье, кексы;

изготовленные из теста и других масс: вафли, пряники, пирожные, торты.

Все мучные кондитерские изделия — это высококалорийные пищевые продукты, так как содержат легкоусвояемые углеводы, жиры, белки.

В мучных кондитерских изделиях всегда содержатся многочисленные микроорганизмы, даже в крекерах, которые выпекаются при 250 °С, остается в жизнеспособном состоянии масса бактериальных спор.

В мучных кондитерских изделиях могут содержаться: КМАФАнМ - не более $5 \cdot 10^4$ КОЕ/г; БГКП — не допускаются в 0,01 г; *Staph. aureus* — не допускается в 0,01 г; дрожжи — допускаются не более 100 КОЕ/г; плесневые грибы — допускаются не более 50 КОЕ/г; патогенные, в том числе сальмонеллы — не допускаются в 25 г.

Staph. aureus довольно часто вызывает пищевые отравления при употреблении тортов и пирожных, особенно с заварным кремом. Дрожжи и плесневые грибы для мучных кондитерских изделий приобретают особое значение как показатели срока годности этих изделий. Чем больше клеток этих микроорганизмов обнаруживается в мучных кондитерских изделиях, тем быстрее они плесневеют либо прокисают, тем меньше их срок годности.

ТЕМА 22 МИКРОБИОЛОГИЯ КУЛИНАРНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Общественное питание представляет собой крупную отрасль хозяйственной деятельности, сочетающую функции производства, реализации продуктов питания и организации их потребления.

Основными задачами общественного питания являются: наиболее полное сохранение питательных веществ пищи; улучшение ее вкусовых достоинств; рациональная технология приготовления; обеспечение разнообразного ассортимента блюд; обеспечение эпидемиологической безвредности пищи.

В технологическом процессе осуществляются непосредственно физическое, химическое, биохимическое воздействие на состояние и свойства сырья, полуфабрикатов с использованием соответствующего оборудования и определенного вида энергии.

Весь технологический процесс осуществляется в нестерильных помещениях с использованием нестерильного сырья разной степени контаминации (обсеменения) микроорганизмами. Сырьем служат вода, мясо, рыба, овощи, мука, крупа, макаронные изделия, жиры, сахар, пряности и др.

Микрофлора сырья для блюд общественного питания весьма разнообразна: бактерии, дрожжи, плесневые грибы, возможны патогенные микроорганизмы. Массовые отравления и заболевания потребителей бывают только в сфере общественного питания.

Из воздуха на сырье и готовые кулинарные изделия могут попадать споры бацилл и клостридий, плесневых грибов, актиномицетов, цисты простейших, микрококки, бактерии группы кишечная палочка.

В воздухе цехов общественных предприятий можно обнаружить микробактерии туберкулеза, стрептококки, стафилококки, которые попадают в воздух при кашле и чихании больных людей. Часть микроорганизмов на полуфабрикаты попадает с водой.

Качество и состав микрофлоры готовых кулинарных изделий зависит от качества и микрофлоры перерабатываемого сырья и вспомогательных компонентов, входящих в рецептуру блюд, от термической обработки, санитарного состояния используемого оборудования, инвентаря, от условий хранения готовых кулинарных изделий.

При первичной обработке сырья и приготовлении полуфабрикатов увеличивается их контаминация. Микроорганизмы попадают с рук персонала, из воздуха, с инвентаря и посуды. Термическая обработка (варка, жарение, запекание) полуфабрикатов значительно (на 2... 3 порядка) снижает число микроорганизмов в 1 г изделия.

На предприятиях общественного питания, выпускающих кулинарные изделия в большом количестве, последующие операции (охлаждение, укладка, упаковка в тару для транспортирования) приводит к увеличению обсемененности продуктов микроорганизмами. Это вторичное инфицирование кулинарных изделий небезопасно для здоровых людей.

Рассмотрим примеры допустимого содержания микроорганизмов в кулинарных изделиях: рыба жареная — не более 100...1000 КОЕ/г КМАФАнМ, кишечная палочка и протей не допускаются в 10 г; рыба печеная — не более 500... 5000 КОЕ/г КМАФАнМ, *E. coli* и протей должны отсутствовать в 10 г;

рыбные котлеты — не более 500... 1000 КОЕ/г КМАФАнМ; заливная рыба — не более 500... 1000 КОЕ/г КМАФАнМ.

В составе микрофлоры рыбных кулинарных изделий преобладают споровые бактерии *Bac. subtilis*, *Bac. megaterium*, *Bac. pumilus*, анаэробы *Cl. putriflcutum*, *Cl. sporogenes*, микрококки. Патогенные микроорганизмы не допускаются.

Мясо на предприятия общественного питания поступает в виде крупнокусковых полуфабрикатов, а также порционных (натуральных и панированных) и мелкокусковых, срок хранения которых 6... 12 ч. Микрофлора мясных полуфабрикатов схожа с микрофлорой мяса, рассмотренной ранее. Однако для мясных полуфабрикатов общая обсемененность КМАФАнМ не должна превышать $1 \cdot 10^5$ КОЕ/г. Патогенные микроорганизмы не допускаются.

Мясной фарш имеет значительно большую обсемененность, так как в процессе приготовления фарша (при измельчении кусков мяса) увеличивается поверхность соприкосновения с воздухом, микроорганизмы получают доступные питательные вещества из вытекающего сока, попадают микроорганизмы из воздуха, с рук персонала, с оборудования. Фарш представляет собой идеальную среду для самых разных микроорганизмов, вызывающих его порчу. В фарше обнаруживаются всевозможные микроорганизмы: бактерии, дрожжи, плесневые грибы, актиномицеты. В фарше допускается наличие не более $1 \cdot 10^7$ КОЕ/г КМАФАнМ. Патогенные микроорганизмы должны полностью отсутствовать.

Многие мясные блюда содержат дополнительные компоненты (овощные и крупяные гарниры), что дополнительно увеличивает КМАФАнМ на один-два порядка. Микрофлора их состоит из спорообразующих бактерий (*Bac. subtilis*, *Bac. pumilus*, *Bac. megaterium*), микрококков, дрожжей, плесневых грибов. Кишечной палочки, протей и сальмонелл не должно быть.

Кулинарные изделия из крупы (каши) и овощей (отварных, жареных) считаются безопасными при содержании КМАФАнМ $1 \cdot 10^2 \dots 10^4$ КОЕ/г.

Добавление соусов увеличивает контаминацию кулинарных изделий. Допустимым содержанием в соусах считаются: КМАФАнМ — $5 \cdot 10^3 \dots 10^4$ КОЕ/г, БГКП — 0,01 г, плесеней — не более 100 КОЕ/г, стафилококки и патогенные микроорганизмы не допускаются.

В салатах из сырых овощей и фруктов КМАФАнМ допускается не более $1 \cdot 10^4$ КОЕ/г, из вареных овощей — не более $5 \cdot 10^3$ КОЕ/г.

В горячих первых и вторых блюдах содержание КМАФАнМ — $5 \cdot 10^2 \dots 10^3$ КОЕ/г.

Кулинарные изделия должны быть реализованы за 12ч.

Необходимо помнить, что хранение оставшихся салатов из свежих овощей в холодильнике может привести к отравлению на следующий день: для возбудителей иерсиниоза температура домашнего холодильника ($5 \dots 8$ °С) является оптимальной для их развития.

ТЕМА 23

МИКРОБИОЛОГИЯ ЯИЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Яйца используют для изготовления яичного меланжа и яичного порошка.

Яичный меланж: — замороженные белки и желтки, реализуемые только в замороженном виде; транспортирование их должно осуществляться только в изотермических вагонах. Хранить необходимо при температуре $-5 \dots -10$ °С, срок хранения 10 мес.

Меланж изготавливают либо в виде смеси белков и желтков и естественной пропорции, либо в виде освобожденной от скорлупы и белка желточной массы, либо в виде яичного белка.

Для производства любого вида меланжа используют яйца, отвечающие требованиям действующих технических условий. Нельзя использовать утиные, гусиные и известкованные куриные яйца, пищевые неполноценные яйца, а также яйца, поступающие из хозяйств, неблагополучных по инфекционным заболеваниям птицы.

Меланж относится к скоропортящимся продуктам; в нем обнаруживают большое количество микроорганизмов. Состав этой микрофлоры крайне разнообразен и зависит от чистоты яиц, рук рабочих, а также чистоты воздуха в цехах переработки яиц. Основным источником обсеменения меланжа микроорганизмами является скорлупа. Яйца необходимо дезинфицировать.

Наиболее часто в готовом меланже обнаруживают различные виды кокков, плесневых грибов, *Pr. vulgaris*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *E. coli*, патогенных микроорганизмов, особенно сальмонелл.

В процессе замораживания и хранения меланжа микроорганизмы отмирают. Процесс отмирания протекает постепенно в течение всего срока хранения. Например, количество сальмонелл за 6 мес хранения меланжа может уменьшиться в 1000, *E. coli* — в 100, общая обсемененность — в 40 раз. Однако полностью микроорганизмы никогда не отмирают, поэтому, чтобы уменьшить их число, меланж пастеризуют при температуре 80...85°C либо перемешивают с сахаром в соотношении 1:1. В осахаренном меланже сальмонеллы отмирают уже через 2... 3 мес при комнатной температуре хранения. Осахаривание повышает порог коагуляции яичного белка и желтка. Отмирание сальмонелл происходит при нагревании его в толще яичной массы до 75 °С в течение 40 мин и до 80 °С в течение 15 мин.

Из осахаренного и пастеризованного яичного меланжа в отдельных случаях выделяют дрожжи, стрептококки, клостридии. *K coli* и *Pr. vulgaris* отмирают постепенно.

Размороженный меланж следует использовать в течение нескольких часов, иначе он испортится.

В настоящее время широко используется метод сублимационной сушки пищевых продуктов, при котором 75... 90 % влаги испаряется в вакууме при отрицательной температуре.

Яичный порошок получают высушиванием яичной массы путем ее распыления в специальных камерах при температуре, не превышающей 60 °С. Для этого используют куриные столовые яйца (кроме известкованных) и яичный мороженный меланж, отвечающий соответствующим требованиям. Правильно полученный яичный порошок хорошо впитывает воду и обладает свойствами свежих яиц. Доброкачественный яичный порошок имеет светло-желтый цвет, вкус и запах, свойственные высушенному яйцу.

В яичном порошке должно содержаться (%) не более 9 влаги и 4 золы; не менее 45 белковых веществ и 35 жира.

Преимуществами яичного порошка являются уменьшенные объем и масса, возможность хранения в неохлажденном помещении, хорошая транспортабельность.

В яичном порошке обнаруживают в жизнеспособном состоянии спорообразующие бактерии, стафилококки, стрептококки, *E. coli*, иногда отдельных представителей сальмонелл. В процессе хранения происходит частичное отмирание микроорганизмов. Срок хранения яичного порошка при температуре не выше 20 °С и относительной влаж-

ности воздуха не выше 75 % составляет около 6 мес; при температуре 2 °С и ниже и относительной влажности 60... 70 % — до двух лет.

Санитарно-микробиологические исследования яичных продуктов и яиц проводят при контроле птицефабрик и пищевых производств, а также при наличии эпидемиологических и эпизоотических показаний. Определяют КМАФАнМ, коли-титр, наличие сальмонелл, *Pr. vulgaris* и, если необходимо, другие микроорганизмы.

Коли-титр должен быть не ниже 0,1 г. Сальмонеллы должны отсутствовать.

Если в яичных продуктах обнаруживают патогенные микроорганизмы, то такие продукты нельзя использовать для пищевых целей. Заключение на это дает СЭС.

ТЕМА 24 МИКРОБИОЛОГИЯ МОРЕПРОДУКТОВ

Морепродукты, или нерыбные объекты морского промысла (ракообразные и моллюски), как и рыба, являются скоропортящимся сырьем. Содержание экстрактивных небелковых азотистых веществ в мясе беспозвоночных больше, чем в мясе рыбы, поэтому ферментативные и бактериальные процессы протекают в нем значительно быстрее, чем в мясе рыбы.

Беспозвоночные, за исключением головоногих моллюсков, являются придонными животными, поэтому их первоначальная микрофлора соответствует микрофлоре морских осадков, ила и морской воды. В воде загрязненных заливов и эстуариев обнаруживаются и потенциально опасные микроорганизмы.

Состав микрофлоры ракообразных и моллюсков изменяется в зависимости от среды их обитания, типа питания, температуры окружающей среды, сезона, способа лова и т.д.

Микробиология ракообразных.

К группе ракообразных относятся креветки, крабы, омары и лангусты.

Креветок ловят обычно тралом. После траления в течение 1... 3 ч сеть выбирают и улов выливают на борт траулера. Затем креветок сортируют, разделяют и промывают. Промывка креветок во время выгрузки из морской воды способствует снижению общего числа микроорганизмов. Контаминация свежельовленных тихоокеанских кре-

веток колеблется от 8,7-102 до $1,3 \cdot 10^6$ КОЕ/г. Качественный состав микроорганизмов во многом зависит от загрязненности района лова, а также сезона лова. На свежевыловленных креветках обнаруживаются бактерии родов *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Moraxella*. Например, на свежих креветках, выловленных в Китайском море, были обнаружены спорообразующие бактерии, кокки, актиномицеты, дрожжи и плесневые грибы из рода *Aspergillus*, а на креветках, выловленных у восточного побережья центральной Флориды, доминировали *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Planococcus*; бактериальная обсемененность составляла 1,5-105 КОЕ/г.

Промытых целых и обезглавленных креветок укладывают в контейнеры и пересыпают льдом. Обезглавленные креветки хранятся до 2 недель, сохраняя хорошее качество, а целые креветки — не более 5 сут. Установлено, что в головогруды креветок содержится около 75 % всех присутствующих в креветках бактерий.

Большое значение имеет скорость охлаждения креветок. При начальной обсемененности $1 \cdot 10^4$ КОЕ/г-креветки сохраняются в хорошем виде 12 ч при температуре 27 °С, 1 сут при 20 °С, 6 сут при 0 °С, 8 сут при -11 °С. Креветок охлаждают не только во льду, но и в охлажденной морской воде и хранят в трюмах при температуре около 0 °С. Так хранят только неразделанных креветок. Допустимый срок хранения креветок в охлажденной морской воде составляет несколько суток. Основной причиной порчи тропических креветок является действие ферментов тканей креветок, а не влияние ферментативной активности сопутствующей микрофлоры, так как при соблюдении режимов холодильного хранения мезофильная микрофлора не развивается.

Наилучшим способом консервирования креветок является замораживание. Креветки, замороженные сразу же после вылова, имеют отличное качество при хранении в течение 12 мес (при температуре -18 °С). Микробная обсемененность замороженных креветок зависит от качества сырья. В замороженных креветках число клеток микроорганизмов снижается следующим образом: через сутки — на 50 %, через 2 мес — на 85 %, после хранения в течение 2... 12 мес — на 48...99%. Микрофлора замороженных креветок представлена как мезофильными, так и психрофильными микроорганизмами. Более 70 % составляли аэробные мезофилы и аэробные психрофилы: грамположительные бактерии родов *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, грамотрицательные — родов *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и др.

Условно-патогенные микроорганизмы в свежевыловленных креветках обычно не обнаруживаются, однако при обработке, контакте с

загрязненной палубой, льдом, оборудованием креветки могут инфицироваться этими микроорганизмами. В креветках были обнаружены коли-формы, энтерококки, стафилококки, перфрингенс; при вылове креветок из загрязненных водоемов иногда выделяют сальмонеллы.

В 1910 г. в Японии и Норвегии при употреблении консервов из креветок были зарегистрированы вспышки отравления ботулизмом, поскольку споры *Cl. botulinum* очень устойчивы и сохраняются в консервах даже после их стерилизации. Для снижения образования токсина *Cl. botulinum* в креветочное мясо вводят 4%-ный NaCl и сорбиновую кислоту (30...40 мг%).

Крупных тихоокеанских крабов вылавливают в декабре — апреле. После выгрузки из орудий лова крабов охлаждают при температуре 5...8°C. Затем их сортируют по размерам и физическому состоянию.

После вылова крабов сортируют и сразу же направляют на переработку. Живых крабов рекомендуется хранить при температуре 2...5°C в течение 12...36 ч. Их перевозят в двухстенных ящика упакованными в сухие древесные стружки или морскую траву.

Панцирные покровы, жабры и внутренности крабов содержат большое число микроорганизмов, типичных для грунтов, но основном в микрофлоре преобладают споровые бактерии *B. subtilis*, *Bac. megaterium* и др.

Микрофлору крабового мяса можно подразделить на три группы: микроорганизмы, выделенные из сырых крабов и доминирующие в период холодильного хранения: *Moraxella*, *Pseudomonas Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytofaga*;

микроорганизмы, которые не развивались в период хранения *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, микроорганизмы, внесенные во время обработки, но не развивающиеся в охлажденном мясе (*Proteus*).

При замораживании мяса крабов качественный состав микрофлоры изменяется незначительно.

Мясо крабов замораживают при температуре -40°C и глазируют водой с 1%-ной аскорбиновой и лимонной кислотами в соотношении 1:4. Замороженные образцы хранят при температуре -23°C.

Такая глазировка способствует сохранению естественного цвета мяса крабов в течение 420 сут.

Крабы консервируют, для чего их разделяют, варят в кипящей воде в течение 10... 15 мин, охлаждают на воздухе в течение 1 ч, отделяют мясо от панциря, солят, промывают водой, укладывают в банки. Инфицирование мяса крабов зависит от санитарно-гигиенического состояния предприятия, а также от исходной обсемененности. Все процессы должны

проводиться в соответствующих санитарных условиях.

Термическая обработка проводится при температуре 82 °С в течение 31 мин, при этом микробная обсемененность в крабовом мясе промышленной пастеризации составляет $1 \cdot 10^5$ КОЕ/г. Микрофлора включает в себя грамположительные бесспорные бактерии, вырабатывающие молочную кислоту.

В мясе крабов обнаруживаются условно-патогенные и токсигенные микроорганизмы.

Стафилококки чаще всего попадают в готовый продукт в процессе очистки вареного крабового мяса. В мясе крабов довольно часто встречаются сальмонеллы, *Vibrio parahaemolyticus*, *Cl. perfringens*.

Однако хранение мяса крабов при низкой температуре приводит к отмиранию этих микроорганизмов. Отравления, вызываемые *Cl. perfringens* при употреблении морепродуктов, сравнительно редки, однако ввиду широкого распространения этого микроорганизма в кишечниках беспозвоночных следует контролировать его присутствие, особенно в готовых продуктах. Иногда в мясе крабов обнаруживаются споры *Cl. botulinum*. Чтобы избежать развития спор *Cl. botulinum*, необходимо соблюдать следующие условия: темпера-

тура хранения должна быть менее 10 °С (лучше 3...4 °С), pH — до 6,5, содержание NaCl — 5 %, NaNO₂ — 200 частей на 1 млн.

Выловленных омаров обычно охлаждают во льду целыми. В охлажденных омарах преобладают бактерии родов *Pseudomonas* и *Achromobacter*. Омары, хранящиеся во льду при температуре 2,2 °С, после 8... 10 сут становятся несъедобными из-за кислого привкуса и запаха аммиака.

При последующей обработке омары варят в морской воде или в 5%-ном солевом растворе. Общая обсемененность омаров при парке уменьшается на один порядок. При хранении вареного мяса омаров в охлажденном состоянии в течение 14 сут численность микроорганизмов в нем достигает $1 \cdot 10^6$ КОЕ/г. Мясо приобретает посторонний неприятный запах. Более приемлемым оказалось хранение омаров в варено-мороженом виде. Обычно вареных омаров разделяют, удаляют панцирь, мясо замораживают в брикетах.

Срок хранения при температуре -18 °С составляет около 5 мес, при температуре -12 °С — не более 3 мес.

В мясе омаров очень редко обнаруживаются условно-патогенные и токсигенные микроорганизмы *Staphylococcus*, колиформы, фекальные кишечные палочки, а если обнаруживаются, то в очень малых количествах.

Характер порчи мяса омаров отличается от порчи рыбы. В процессе хранения рН мяса омаров возрастает с 6,7 до 8,0, что свидетельствует об образовании большого количества оснований.

Установлено, что при рН 7,8 охлажденный омар непригоден для пищевого использования.

Лангусты с исходной микробной обсемененностью от $2 \cdot 10$ до $4,8 \cdot 10^2$ КОЕ/г сохраняются в охлажденном состоянии в течение 10 сут без заметного изменения качества, несмотря на увеличение числа микроорганизмов до $1,4 \cdot 10^5$ КОЕ/г. При большой исходной обсемененности на 10-е сутки хранения начинается порча, увеличивается число гнилостных бактерий. Хранить лангустов рекомендуется не более 5 сут.

При температуре замораживания лангустов -25 °С и хранении в течение 3,5 мес обсемененность их микроорганизмами снижалась на 99,9 %. При большой исходной обсемененности лангустов после их замораживания остается много жизнеспособных микроорганизмов, а повышение температуры хранения приводит к ухудшению их качества и снижению сроков хранения. Обычно мясо лангустов замораживают в брикетах и хранят при температуре -12 °С не более 3 мес. В мясе замороженных лангустов не обнаруживались сальмонеллы и золотистый стафилококк.

Микробиология двусторчатых моллюсков

К группе моллюсков относятся устрицы, мидии, гребешки и кальмары.

Охлажденные льдом *устрицы* и *мидии* содержат мезофильные микроорганизмы как в мясе, так и в соке. В процессе хранения число мезофильных микроорганизмов снижается, а психрофильных — постепенно увеличивается. При правильном хранении общее количество микроорганизмов в устрицах колеблется от $0,5 \cdot 10^6$ до $1 \cdot 10^6$ КОЕ/г. Обычно в таких образцах обнаруживается около 5 КОЕ/г *E. coli*. Такие же показатели у мидий. В микрофлоре охлажденных устриц (температура 7 °С) преобладают *Lactobacillus* и *Pseudomonas*. Порчу вызывают бактерии *Lactobacillus*, возможно этому способствует высокое содержание в них гликогена.

В Японии устриц хранят в замороженном состоянии. Предварительно подсолненные и упакованные в полиэтиленовые пакеты устрицы хорошо сохраняются при температуре -30 °С и ниже в течение 12 мес.

В США при замораживании устриц используют Flavor Tex — пищевое покрытие, которое улучшает качество устриц, снижает поте-

ри, предохраняет от высыхания.

Гребешков следует хранить во льду в течение 8... 10 сут, при этом число микроорганизмов увеличивается от $1 \cdot 10^2$ до $1 \cdot 10^5$ КОЕ/г.

После шестисуточного хранения среди них преобладают роды *Moraxella* и *Acinetobacter* (90 %), что способствует порче гребешков. В последнее время особую популярность приобрели консервы и кулинарные изделия из *кальмаров*. Изучение микробной обсемененности свежельвовленных кальмаров показало наличие на них кокков и грамотрицательных палочек. Обсемененность кальмаров колебалась от $3,1 \cdot 10^2$ до $2,4 \cdot 10^3$ КОЕ/г. Термическая обработка — кипячение в течение 4...5 мин — уничтожает значительное количество микроорганизмов. Санитарно-показательные микроорганизмы из кальмаров не выделены.

Варка кальмаров в течение 10... 15 мин достаточна для получения продукта хорошего качества. Микробная обсемененность кальмаров в процессе приготовления консервов колеблется от $4,2 \cdot 10^2$ до $5,7 \cdot 10^5$ КОЕ/г. Кулинарные изделия из кальмаров имеют низкую микробную обсемененность.

В моллюсках часто обнаруживаются санитарно-показательные и патогенные микроорганизмы, число и видовой состав которых зависят от сезона и районов лова. Например, содержание энтеробактерий в моллюсках наиболее высоким было в летний период, когда число *E. coli* и *A. aerogenes* превышало $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл. В моллюсках, выловленных в загрязненных районах, встречаются *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *Mytilusedulis*, споровые анаэробы *Cl. Perfringens* и *C. botulinum*.

Степень микробной обсемененности моллюсков и их порчи зависит также от бактериологического состояния воды. Если вода заражена бактериями, то они накапливаются во внутренностях моллюсков. Моллюски, инфицированные психрофильными микроорганизмами, могут вызывать различные заболевания (сальмонеллез, брюшной тиф, дизентерию, холеру).

ТЕМА 25 МИКРОБИОЛОГИЯ ЗЕРНОВЫХ ПРОДУКТОВ

Микробиология зерна

Микроорганизмы существенно влияют на качество зерновых продуктов при их производстве и хранении. Микрофлора крупы, муки и даже хлеба зависит от микрофлоры перерабатываемого зерна. Степень обсемененности свежесобранного зерна, крупяных сельскохозяй-

ственных культур, а также одной и той же культуры в течение нескольких лет выращивания может значительно меняться в зависимости от загрязненности района выращивания. В 1 г доброкачественного зерна (пшеницы, ячменя, проса, риса, овса, гречихи и т.п.) находятся тысячи и миллионы клеток микроорганизмов. Качественный состав микрофлоры указанных сельскохозяйственных культур следующий: 90 % всех микроорганизмов зерна составляют бактерии, 5...7 % — споры плесневых грибов и небольшое число дрожжей. Среди бактерий зерна преобладает вид *Erwinia herbicola* — бесспорная, факультативно-аэробная палочка, которую называют еще гербиколой. Считается, что большое число клеток гербиколы на зерне является показателем хорошего качества зерна.

Встречаются также микрококки, молочнокислые бактерии, споровые аэробные палочки *Bac. Subtilis*.

Среди плесневых грибов свежесобранного зерна преобладают *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ascochyta*, которые называют полевыми плесенями. Среди плесневых грибов свежесобранного зерна мало пенициллов и аспергиллов.

По мере хранения зерна состав грибов зерна изменяется: полевые плесени отмирают, а доминирующими плесенями становятся пенициллы и аспергиллы, которые называют плесенями хранения.

Жизнедеятельность микрофлоры зерновой массы зависит от температуры окружающей среды. Большинство бактерий и грибов, обитающих на зерне, относится к мезофилам, оптимальная температура развития которых 25... 30 °С. Влияние температуры на развитие микроорганизмов в зерновой массе находится в зависимости от влажности зерна. Исследования показали, что чем выше влажность зерна пшеницы, тем в более широких температурных границах происходит развитие микроорганизмов.

При понижении температуры до 10 °С большинство мезофильных микроорганизмов прекращают активное развитие в зерновой массе. Многие из них сохраняют свою жизнеспособность, а некоторые могут развиваться при температуре ниже 10°С. Особенно устойчивы к пониженным температурам *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thamnidium*, *Fusarium* и др. Понижение температуры в большинстве случаев лишь приостанавливает развитие микроорганизмов, но не вызывает их гибели.

Методы оценки качества зерна основаны на изменении органолептических показателей: запаха, цвета и т.п. Однако они достаточно субъективны. Наиболее объективной оценкой качества (свежести) зерна является степень зараженности его микроорганизмами, количественный и качественный состав которых может дать достоверный

показатель качества зерна и спрогнозировать безопасность дальнейшего хранения.

Исследования образцов зерна из промышленных зернохранилищ показали, что начальные стадии его порчи были постоянно связаны с ксерофилами: *Asp. restrictus* и *Asp. glaucus*, которые способны развиваться при критической и ниже критической влажности зерна. Более требовательные к влаге мезофиллы — *Asp. candidus*, *Asp. ochraceus*, *Asp. flavus*, *Penicillium* — развиваются позднее, когда вследствие роста ксерофилов влажность зерна возрастает.

По мере хранения зерна в условиях, не допускающих развития микроорганизмов, число их на зерне снижается за счет отмирания *Erwinia herbicola*, хотя она остается преобладающей формой.

Микробиология крупы

Микрофлора крупы по качественному составу близка микрофлоре зерна, из которого она изготовлена, но количество микроорганизмов в ней несколько меньше. На обсемененности крупы микроорганизмами сказывается характер предварительной обработки зерна: степень шелушения, шлифовки, технология производства. Так, крупа, полученная из зерна, подвергшегося гидротермической обработке — пропариванию, содержит меньше микроорганизмов, чем крупа, полученная из непропаренного зерна (табл.). В крупе выявляется вторичная микрофлора, которая попадает в крупу из окружающей среды в процессе производства.

Таблица 13

Вид крупы	Число микроорганизмов	
	бактерии	плесени
Ядрица непропаренная	$1,2 \cdot 10^5$	$14 \cdot 10^2$
Ядрица пропаренная	$3 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^2$
Перловая	$7,2 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^2$
Ячневая	$9,9 \cdot 10^5$	$0,9 \cdot 10^2$
Рис	$3 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$
Пшено непропаренное	$1 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^2$
Пшено пропаренное	$7,2 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^2$
Кукуруза шлифованная	$9,3 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$
Овсяная	$2,2 \cdot 10^4$	$0,1 \cdot 10^3$
Овсяные хлопья	$5,3 \cdot 10^3$	$0,1 \cdot 10^3$

Преобладающим компонентом бактериальной флоры крупы, изготовленной из непропаренного зерна, является *Erwinia herbicola*, а в крупе из зерна, прошедшего гидротермическую обработку, характерно преобладание спорных бактерий и микрококков. Из спорных бактерий чаще всего обнаруживаются *Bac. subtilis* и *Bac. pumilus*. Плесени представлены чаще всего пенициллами и аспергиллами, иногда выявляются мукооровые грибы.

Микроорганизмы, найденные в крупе, способны разлагать белок, липиды, крахмал, пектиновые вещества и сбраживать сахара с образованием кислот. Плесневые грибы, обнаруживаемые в крупе, вырабатывают микотоксины, поэтому крупы в период длительного хранения могут подвергаться различным видам порчи под действием микроорганизмов и имеющихся в крупе ферментов. Возможность и интенсивность развития микроорганизмов определяется влажностью крупы, которая меняется при хранении в зависимости от величины относительной влажности воздуха и температуры хранения.

Микробиология муки

Качественный и количественный состав микрофлоры муки.

Микрофлора свежемолотой муки представлена микроорганизмами перерабатываемого зерна. Основная масса бактерий (до 90 %) представлена видом *Erwinia herbicola*, в меньшей степени — спорными бактериями *Bac. mesentericus* и *Bac. subtilis*. Иногда обнаруживаются *Bac. pumilus*, *Bac. cereus*, микрококки, молочнокислые и уксуснокислые бактерии, дрожжи и споры плесеней. Плесени муки представлены родами *Penicillium* и *Aspergillus*, реже мукооровыми.

Микрофлора муки количественно беднее микрофлоры перерабатываемого зерна. При очистке зерна перед помолом и в процессе помола часть микроорганизмов удаляется вместе с загрязнениями и оболочками зерна, богатыми микроорганизмами. Степень обсеменения муки микроорганизмами колеблется в широких пределах и определяется степенью обсеменения исходного зерна, характером его подготовки к помолу, способом помола, выходом муки, ее сортом. Чем ниже сорт муки, тем больше в нее попадает периферийных частиц зерна, тем больше содержится в ней микроорганизмов. Число спор плесеней в муке всех сортов больше, чем в перерабатываемом зерне, так как эти споры попадают в муку из окружающей среды. Мука является менее стойким продуктом, чем зерно и крупа, так как имеет более мелкие частицы разрушенного зерна, а питательные вещества муки более доступны микроорганизмам. Однако при правильном режиме хранения (при низкой влажности муки) развития микроорганизмов, попавших в

муку, не происходит. Наблюдается даже некоторое отмирание бактерий. С повышением относительной влажности воздуха микроорганизмы, попавшие в муку и находящиеся в ней в неактивном состоянии, начинают развиваться. Первыми развиваются плесени, которые растут при минимальной влажности (при $a_r \gg 0,6$). Многие плесени обладают протеолитическими и липолитическими ферментами, способны осахаривать крахмал. Хлебопекарные свойства муки при плесневении снижаются, мука приобретает неприятный затхлый запах, который обычно передается хлебу.

Виды микробной порчи муки. Наиболее распространенным видом порчи муки является плесневение. Чаще всего на муке обнаруживаются плесени родов *Penicillium* и *Aspergillus*, которые синтезируют микотоксины. Многие из них термоустойчивы и могут сохраняться в хлебе. Поэтому плесневелая мука является небезопасным продуктом.

Прокисание муки вызывают молочнокислые бактерии и другие виды, способные образовывать кислоту. Как правило, они развиваются в муке при ее увлажнении.

Прогоркание муки обусловлено окислением ее липидов как при участии кислорода воздуха, так и при деятельности микроорганизмов.

Длительное хранение зерновых продуктов (2...3 года) допустимо при температуре 15... 20 °С при содержании в них влаги, эквивалентной относительной влажности воздуха 65 %. Предельная относительная влажность воздуха (72...75%) обеспечивает кратковременное хранение зернопродуктов в течение лишь 3...4 мес.

Микробиология хлеба

Качество муки и состав ее микрофлоры имеют большое значение при производстве хлеба: они влияют на нормальный процесс приготовления теста и отражаются на качестве хлеба.

При выходе из печи поверхность хлеба практически стерильна и лишь в мякише сохраняется какое-то число спор микроорганизмов. Однако во время охлаждения, транспортирования, хранения и реализации хлеба споры могут прорасти, что и приводит к микробной порче хлеба.

Основные виды микробной порчи хлеба.

Тягучая (картофельная) болезнь хлеба вызывается споровой бактерией *Bac. subtilis*. Термоустойчивые споры этих бактерий, всегда присутствующие в муке, могут попадать в тесто с оборудования, из воздуха производственных цехов хлебозаводов. Клетки *Bac. subtilis* вызывают гидролиз крахмала с образованием большого количества декстринов. В начальной стадии развития заболевания хлеб приобре-

тает посторонний фруктовый запах, затем мякиш ослизняется, темнеет, становится липким, тянется нитями. Пораженный хлеб непригоден в пищу. На клетки *Bac. subtilis* угнетающе действует повышенная кислотность среды, поэтому тягучая болезнь хлеба бывает преимущественно у пшеничного хлеба, который имеет более низкую кислотность, чем ржаной.

Для предотвращения тягучей болезни хлеб после выпечки быстро охлаждают до температуры 10... 12 °С и хранят при этой температуре в хорошо вентилируемом помещении. Кроме того, можно подкислять тесто уксусной, пропионовой, сорбиновой кислотами или их солями. В тесто из пшеничной муки можно вводить закваски чистых культур пропионово-кислых бактерий или мезофильной молочнокислой палочки *Lactobacillus fermentum*. Угнетающее действие этих бактерий на *Bac. subtilis* обусловлено как подкислением среды, так и действием антибиотических веществ.

Меловая болезнь хлеба вызывается дрожжеподобными грибами, которые попадают в тесто с мукой и сохраняются при выпечке хлеба. На готовый хлеб возбудитель может попасть из окружающей среды. Болезнь проявляется вначале на поверхности хлеба, затем по трещинам распространяется в нутрь мякиша. Проявляется в виде белых, сухих порошкообразных включений похожих на мел. Хлеб теряет товарный вид и приобретает неприятный вкус.

Плесневение является наиболее распространенным видом порчи хлеба. Этот вид порчи возникает при неправильном режиме хранения: слишком плотной укладке, повышенной влажности и температуре. Споры плесеней, попавшие на готовый хлеб, быстро развиваются, особенно если на хлебной корочке есть трещины. Плесневению хлеба чаще способствуют грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Mucor*, вызывающие гидролиз крахмала и белков. Хлеб приобретает неприятный затхлый запах и вкус. Заплесневелый хлеб в пищу не пригоден, так как грибы образуют микротоксины и афлотоксины, которые концентрируются в наружных слоях хлеба, но и выявляются и в мякише.

Для борьбы с плесневением хлеба используют различные методы: обрабатывают поверхность хлеба или упаковочного материала химическими консервантами (этиловым спиртом, солями пропионовой и сорбиновой кислот), стерилизуют упакованный хлеб токами высокой частоты и др. хороший эффект дает замораживание хлеба. Однако основным мероприятием обеспечивающим высокое качество хлеба является строгое соблюдение установленного режима технологи производства и санитарно-гигиенических требований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ассонов Н.Р. Микробиология. М.: Колос, 1997. 352 с.
2. Вербина Н.М., Каптерева Ю.В. Микробиология пищевых производств. М.: Агропромиздат, 1988. 256 с.
3. Госманов Р.Г., Ибрагимова А.И., Галиуллин А.К. Микробиология и иммунология. СПб.: Лань, 2013. 240 с.
4. Гусев М.В. Микробиология. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 464 с.
5. Долганова Н.В., Першина Е.В., Хасанова З.К. Микробиология рыбы и рыбных продуктов. СПб.: Изд-во «Лань». 288 с.
6. Земсков М.В., Соколова Т.М. Основы общей микробиологии, вирусологии и иммунологии. М.: Колос, 1977. 312 с.
7. Колычев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология. М.: КолосС, 2003. 432 с.
8. Колычев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и микология. СПб.: Лань, 2014. 624 с.
9. Костенко Т.С. Практикум по ветеринарная микробиология и иммунология. М.: Колос, 2001. 344 с.
10. Кисленко В.Н. Практикум по ветеринарная микробиология и иммунология. М.: КолосС, 2005. 232 с.
11. Кисленко В.Н., Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология. Ч. 1: Общая микробиология. М.: КолосС, 2006. 183 с.
12. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: практикум. СПб.: Изд-во «Лань», 2012. 368 с.
13. Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов. Лабораторный практикум: учеб.-метод. пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ. 85 с.
14. Мудрецова-Висс К.А., Кудряшова А.А., Дедюхина В.П. Микробиология, санитария и гигиена. Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 1997. 312 с.
15. Мюнх Г.Д., Заупе Х., Шрайтер М. Микробиология продуктов животного происхождения. М.: Агропромиздат, 1985. 592 с.
16. Саруханова Л.Е., Волина Е.Г. Санитарно-микробиологическое исследование объектов внешней среды (почвы, воды, воздуха): учебно-методическое пособие. М.: РУДН, 2010. 17 с.
17. Сидоров М.А., Корнелаева Р.П. Микробиология мяса и мясосопродуктов. М.: Колос, 1996. 240 с.
18. Солонко А.А. Практикум по общей микробиологии. Мн.: Ураджай, 2000. 280 с.

Учебное издание

Рябичева Ангелина Евгеньевна
Исаев Хафиз Мубариз-оглы

Микробиология

Учебно-методическое пособие
для проведения лабораторно-практических занятий и
самостоятельной работы занятий студентами по направлению подготовки
19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания
профиль Технология продуктов общественного питания

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 17.04.2018 г. Формат 60x84¹/₁₆.
Бумага офсетная. Усл. п. л. 10,58. Тираж 50 экз. Изд. № 5813.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ